UNTERSUCHUNGEN ZUR PERKUTANEN ABSORPTION UND ZUR RENALEN ELIMINATION DES BLUTEGELWIRKSTOFFES HIRUDIN BEI TIER (SCHWEIN, PAVIAN) UND MENSCH

Rainold Gemmerli

Disbui. München
1987

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Aus der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie in der Chirurgischen Klinik Innenstadt der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. H. Fritz

und aus dem Institut für Medizinische Balneologie und Klimatologie der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. E. Senn

UNTERSUCHUNGEN ZUR PERKUTANEN ABSORPTION UND ZUR RENALEN ELIMINATION DES BLUTEGELWIRKSTOFFES HIRUDIN BEI TIER (SCHWEIN, PAVIAN) UND MENSCH

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Rainold Gemmerli

aus

Augsburg

im Jahr

1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	1. Prof. Dr. H. Fritz
	2. Prof. Dr. W. Forth
Mitberichterstatter:	1. Priv.-Doz. Dr. H. Pratzel
	2. Prof. Dr. E. Hiller
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. U. Seemüller
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	23.07.87

Meinen Eltern
in Dankbarkeit

D A N K

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Februar 1983 bis August 1986 in der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie in der Chirurgischen Klinik Innenstadt der Universität München.

Dem Leiter der Abteilung, **Herrn Prof. Dr. H. Fritz** danke ich sehr herzlich für die Zuteilung der Forschungsaufgabe, die allzeit motivierende Förderung und die Geduld während der endgültigen Abfassung, die durch den Grundwehrdienst unterbrochen wurde.

Besonderen Dank schulde ich **Frau Dr. U. Seemüller**, die mich in das Arbeitsgebiet einführte und mich den größten Teil der Studie über betreute, sowie **Herrn Dr. J. Dodt** für die Durchführung der Vielzahl von radioanalytischen Messungen.

Sehr dankbar bin ich auch **Herrn Priv.-Doz. Dr. H. Pratzel** für die Möglichkeit der experimentellen Zusammenarbeit, für die fruchtbaren Diskussionen zu den Fragen des perkutanen Stofftransportes und für die Bereitschaft, die Aufgabe des Korreferenten zu übernehmen.

Herzlich danken möchte ich weiterhin dem Leiter der Handchirurgie im Hause, **Herrn Prof. Dr. K. Wilhelm** sowie seinen Mitarbeitern für die sehr kooperative Unterstützung im klinischen Teil meiner Arbeit.

Dank gebührt ferner **Herrn Dr. H.-P. Scheuber** und Mitarbeitern für die theoretische und praktische Unterstützung in allen tiermedizinischen Belangen.

Bedanken möchte ich mich auch für die prompte Versorgung mit entsprechenden Hirudin-Präparationen durch die Firma Plantorgan, Bad Zwischenahn, und die sehr gute, stimulierende Zusammenarbeit mit deren Mitarbeitern, **Herrn Prof. Dr. Dr. E. Fink, Herrn Dr. Müller, Herrn Dr. Maschler** und **Herrn Dr. Kratzer.**

*

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG

I. ZIELSETZUNG DER ARBEIT I
II. CHARAKTERISIERUNG DER UNTERSUCHTEN SUBSTANZ HIRUDIN . . I
1. Vorkommen I
2. Historischer Abriß zur Gewinnung I
3. Physiko-chemische Charakterisierung II
4. Einheiten zur Hirudin-Quantifizierung . . . IV
a. Enzymatische Messung IV
b. Radioanalytische Messung V
III. MEDIZINISCHE BEDEUTUNG DES HIRUDINS V
1. Diagnostische Anwendung V
2. Therapeutische Anwendung V
a. Topisch V
b. Systemisch VII
b. Ausblick zur systemischen Anwendung . . . VII

ERSTER TEIL

DIE METHODE DES RADIOIMMUNOBIOASSAY (= RIBA) ZUM SENSITIVEN NACHWEIS BIOLOGISCH AKTIVEN HIRUDINS

A. NOTWENDIGKEIT DES RIBA 1
I. SENSITIVITÄT RADIOIMMUNOLOGISCHER VERFAHREN 1
II. NACHWEIS DER BIOLOGISCHEN AKTIVITÄT 2
III. VORTEILE BEI HUMANVERSUCHEN 2

B. BESCHREIBUNG DER METHODE 2
I. VORBEMERKUNG 2
II. PRINZIP 3
III. VERSUCHSDURCHFÜHRUNG 5
IV. ERSTELLUNG VON STANDARD-EICHKURVEN UND MESSWERTBENENNUNG . . . 6
V. ANWENDUNG 8

C. PROBENVORBEREITUNG 8
I. VORVERSUCHE ZUR PROBENAUFARBEITUNG MITTELS SEP-PAK-C 18-KARTUSCHE . . 8
1. Adsorptionsfähigkeit für Hirudin 9
2. Eluierung des Hirudins 9
3. Fraktionierte Eluierung 10
4. Wiederverwendbarkeit der Kartusche 11
II. OPTIMIERUNG DER PROBENVORBEREITUNG UND NULLWERT-KONTROLLE . . . 11
1. Verwendete Puffer und Protektorsubstanzen bei der Urinproben-Vorbereitung . 12
2. Urinproben-Vorbereitung 13
a. Proben mit hohem Hirudingehalt 13
b. Proben mit sehr hohem Hirudingehalt 14
c. Proben mit niedrigem Hirudingehalt 14
3. Gewebsproben-Vorbereitung 17
a. Verwendete Puffer 17
b. Durchführung 17

D. PROBENADAPTIERTE STANDARD-EICHKURVEN 20
I. URIN-STANDARDKURVEN 20
Typ I: Bei hohem und sehr hohem Hirudingehalt 20
Typ II: Bei niedrigem Hirudingehalt 20
II. HAUTGEWEBE-STANDARDKURVEN 22

INHALTSVERZEICHNIS

ERSTER TEIL

E. FEHLERBETRACHTUNG UND NACHWEISGRENZEN DES RIBA 23
I. FEHLERBETRACHTUNG 23
1. Variationskoeffizienten 23
a. Inter-Assay-Variationskoeffizient 23
b. Intra-Assay-Variationskoeffizient 23
2. Graphische Auswertung der Assay-Varianzen 23
a. Inter-Assay-Varianz 23
b. Intra-Assay-Varianz 23
3. Störfaktoren der Nachweismethodik 26
a. Urinproben 26
b. Hautgewebsproben 26
II. NACHWEISGRENZEN DES RIBA 26
1. Verdünnungsfaktor - Anreicherungsfaktor 26
a. Urinproben 26
b. Hautgewebsproben 26
2. Bedeutung der Standard-Eichkurven 26
3. Probenspezifische Nachweisgrenzen 27
a. Urinproben 27
b. Hautgewebsproben 27

F. STABILITÄTSNACHWEIS FÜR HIRUDIN 28
I. DATEN DER LITERATUR ZUR HIRUDIN-STABILITÄT 28
II. STABILITÄT VON HIRUDIN IN LYOPHILISATEN UND IN URIN 28
1. Während der Lagerung als Lyophilisat 28
2. In Human-Urin während der Lagerung bei -20°C 30
3. Bei Erwärmung auf 31
a. + 60°C für 60 min 31
b. + 80°C für 15 min 31
III. HIRUDIN-STABILITÄT IN EXTRAKTEN VON HAUTGEWEBSPROBEN 32

ZWEITER TEIL

MORPHOLOGISCHE UND FUNKTIONELLE ASPEKTE DER PERKUTANEN PHARMAKON-AUFNAHME

VORBEMERKUNG 33

A. MORPHOLOGIE UND FUNKTION DER MENSCHLICHEN HAUT 33
I. ANATOMIE DER HAUT 33
II. FUNKTIONEN DER HAUT 35
1. Physiologische Funktionen 35
2. Pharmakodynamische Funktionen 35
a. Barriere-Funktion 36
b. Kompartiment-Funktion 36
c. Metabolische Funktion 37

B. WEGE DER PERKUTANEN PHARMAKON-AUFNAHME 38
I. PHARMAKON-AUFNAHME VIA HAUTANHANGSGEBILDE 38
1. Transfollikulärer Weg 38
2. Transglandulärer Weg 38
II. TRANSEPIDERMALE AUFNAHME 38
III. QUANTITATIVE WERTUNG DER PERKUTANEN AUFNAHMEWEGE 39

INHALTSVERZEICHNIS

ZWEITER TEIL

C. TERMINOLOGIE DER PERKUTANEN PHARMAKON-AUFNAHME 40
I. DEFINITION DER PERKUTANEN ABSORPTION 40
1. Penetration 40
2. Permeation 40
3. Resorption 40
II. QUANTIFIZIERUNG DER PERKUTANEN DURCHLÄSSIGKEIT 41
1. Kumulative epidermale Durchtrittsgrößen 42
a. Haut-Permeation (HP) 42
b. Renale Elimination nach Permeation (EP) 42
c. Standard-Haut-Permeation (SHP) 43
d. Renale Standard-Elimination nach Permeation (SEP) . . . 43
2. Intervallbezogene epidermale Durchtrittsraten 44
a. Haut-Permeations-Rate (HPR) 44
b. Renale Eliminations-Rate nach Permeation (ERP) 44
c. Standard-Haut-Permeations-Rate (SHPR) 45
d. Renale Standard-Eliminations-Rate nach Permeation (SERP) . . 45
3. Ergänzende Ausblicke 46

D. FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DES PERKUTANEN STOFFDURCHTRITTS . . . 47
I. TRANSPORTMECHANISMEN ÜBER BIOLOGISCHE GRENZSTRUKTUREN 47
1. Interzelluläre Transportmechanismen 47
2. Intrazelluläre Transportmechanismen 47
II. MECHANISMEN BEI PERKUTANEN TRANSPORTPROZESSEN 47
1. Morphologische Grundlagen der transmembranösen Lipiddiffusion . . 48
2. Quantifizierende Beschreibung des Diffusions-Vorganges . . . 49
3. Inverse Penetration 49

E. VARIATIONSPARAMETER INTEGUMENTALER DURCHLÄSSIGKEIT 50
I. PHYSIKALISCHE VARIATIONSPARAMETER 50
1. Mechanische Einflüsse 50
a. Druck und Zug 50
b. Enthaarung 50
c. Klebestreifen-Stripping 50
2. Ultraschall-Einwirkung (Phonophorese) 51
3. Thermische Einflüsse 51
4. Einflüsse durch elektrischen Strom 52
5. Einfluß der Hautdurchfeuchtung (Hydratation) 53
II. CHEMISCHE VARIATIONSPARAMETER 54
1. pH-Wert - Bedeutung und Beeinflußbarkeit 54
2. Bedeutung oberflächenaktiver Substanzen 54
3. Toxische Einflüsse 55
a. Schadstoffe 55
b. Medikamente 55
c. Desinfektionsmittel, Hautpflegemittel und Kosmetika . . . 55
III. INDIVIDUELLE VARIATIONSPARAMETER 56
1. Biologische Einflußgrößen 56
2. Pathologische Determinanten 56
IV. PHARMAKOLOGISCHE ASPEKTE 57
1. Determinanten externer Pharmaka 57
a. Wirkstoff 57
b. Galenik 58
c. Zusatzstoffe 58
2. Applikationsmodus 58
a. Vorbehandlung des Applikationsareals 58
b. Art des Auftrags 58
c. Verweildauer des Pharmakon-Reservoirs 58
d. Häufigkeit der Applikation 59
3. Absorptionsverbessernde Substanzen 59

INHALTSVERZEICHNIS

DRITTER TEIL

DURCHFÜHRUNG UND ERGEBNISSE DER ABSORPTIONS- UND ELIMINATIONSSTUDIEN MIT HIRUDIN BEI TIER UND MENSCH

VORBEMERKUNG 60

A. RENALE HIRUDIN-ELIMINATION NACH TOPISCHER APPLIKATION BEIM SCHWEIN . . 61
I. VERSUCHSZIEL 61
II. EXPERIMENTELLE DURCHFÜHRUNG 61
1. Versuchstier 61
2. Verwendetes Applikat 61
3. Versuchsgestaltung 61
4. Nachweismethode 61
III. ERGEBNISSE 62
1. Meßwerte 62
2. Auswertung 62
3. Zusammenfassung und Schlußfolgerung 63
IV. DISKUSSION DER ERGEBNISSE 64
1. Anlaufzeit ("lag-time") der renalen Elimination 64
2. Dauer der Elimination 64
3. Pharmakon-Reservoir 64

B. HIRUDIN-NACHWEIS IN HAUTGEWEBSPROBEN NACH TOPISCHER APPLIKATION BEIM SCHWEIN . 65
I. ZIELSETZUNG DES VERSUCHS 65
II. EXPERIMENTELLE DURCHFÜHRUNG 65
1. Versuchstier 66
2. Verwendetes Applikat 66
3. Versuchsgestaltung 66
4. Nachweismethode 68
III. ERGEBNISSE 69
Meßwerte und Auswertung 69
1. Bestimmung der Hirudin-Gewebekonzentration in den Proben . . . 69
2. Einfluß der Hautreinigung und der Art der Probe 70
IV. DISKUSSION DER ERGEBNISSE UND SCHLUSSFOLGERUNGEN 71
Vorbemerkung 71
1. Bedeutung der postapplikatorischen Hautoberflächen-Reinigung . . 71
2. Bedeutung der Probentrennung in Teilproben 72
3. Vorteil der subkutanen Probenentnahme 73

C. RENALE ELIMINATION VON HIRUDIN NACH INTRAVENÖSER APPLIKATION BEIM PAVIAN . . 74
I. ZIEL UND NOTWENDIGKEIT DER PRIMATEN-VERSUCHE 74
1. Bestimmung des transkorporalen Verlustes für Hirudin . . . 74
2. Ermittlung der Ausscheidungskinetik 74
3. Untersuchung der intravenösen Verträglichkeit 74
II. EXPERIMENTELLE DURCHFÜHRUNG 76
1. Versuchstiere 76
2. Versuchsgestaltung 76
3. Verwendetes Applikat 77
4. Probenmaterialien 78
a. Spontan-Urin 78
b. Katheter-Urin 78
c. Venöses Blut 78
5. Nachweismethoden 78
a. Radioimmunobioassay (RIBA) 78
b. Gerinnungslabor 78

INHALTSVERZEICHNIS

DRITTER TEIL

C. III. ERGEBNISSE 79
1. Tierbeobachtung 79
a. Versuchsbegleitende Verhaltenskontrolle 79
b. Postexperimentelle Beobachtungsphase 79
2. Meßwerte 79
a. Hirudin-Elimination 79
b. Veränderungen im Gerinnungsstatus 79
3. Auswertung 79
a. Individuelles Eliminationsverhalten 79
b. Applizierte Dosis und renale Elimination 82
c. Beeinflussung der Blutgerinnung 83
d. Applizierte Dosis und Diurese 86
IV. DISKUSSION DER ERGEBNISSE 88
1. Renale Eliminationskinetik 88
2. Applizierte Dosis und prozentuale Elimination 89
3. Applizierte Dosis und Diurese 89
4. Sensibilisierung 89
5. Veränderungen in der Blutgerinnung 90
a. Plasmatische Parameter 90
b. Korpuskuläre Parameter 90
6. Systemische Verträglichkeit 91

D. RENALE HIRUDIN-ELIMINATION NACH TOPISCHER APPLIKATION BEIM MENSCHEN . . 92
I. SPONTANE PERKUTANE ABSORPTION 92
1. Versuchsziel 92
2. Experimentelle Durchführung 92
a. Probanden 92
b. Verwendetes Applikat 92
c. Versuchsgestaltung 93
d. Nachweismethoden 94
3. Ergebnisse 95
a. Begutachtung der bestrichenen Haut 95
b. Meßwerte 95
c. Auswertung 97
4. Diskussion und Beurteilung der Ergebnisse 98
a. Permeationsparameter 98
b. Eliminationskinetik 99
c. Mehrfachapplikation 99
d. Blutgerinnung 99
II. PERKUTANE ABSORPTION IM ELEKTRISCHEN FELD 100
1. Versuchsziel 100
2. Experimentelle Durchführung 100
a. Proband 100
b. Verwendetes Applikat 100
c. Versuchsgestaltung 100
d. Nachweismethode 101
3. Ergebnisse 102
a. Verlaufsbeobachtung 102
b. Meßwerte 102
c. Auswertung 103
4. Diskussion und Beurteilung der Ergebnisse 104
a. Stromfreie Phase 104
b. Einwirkung des Gleichstromfeldes 104

INHALTSVERZEICHNIS

DRITTER TEIL

E. HIRUDIN-NACHWEIS IN HAUTGEWEBSPROBEN NACH TOPISCHER APPLIKATION BEIM MENSCHEN . 107
VERSUCHSZIEL 107
I. VORVERSUCH 107
1. Experimentelle Durchführung 107
a. Proband 107
b. Versuchsgestaltung 107
c. Verwendetes Applikat 108
d. Nachweismethode 108
2. Ergebnisse 109
a. Probenadaptierte Standardkurve 109
b. Meßwerte und Auswertung 110
3. Diskussion und Beurteilung der Ergebnisse 112
4. Zusammenfassende Beurteilung 112
II. KLEINSERIE MIT FALLZAHL N = 4 113
1. Experimentelle Durchführung 113
a. Probanden 113
b. Versuchsgestaltung 113
c. Verwendetes Applikat 114
d. Nachweismethode 114
2. Ergebnisse 115
a. Probenadaptierte Standardkurve 115
b. Meßwerte und Auswertung 116
3. Diskussion und Beurteilung der Ergebnisse 117
4. Zusammenfassende Beurteilung 118
III. ERWEITERTE STUDIE MIT FALLZAHL N = 19 119
1. Experimentelle Durchführung 119
a. Probanden 119
b. Versuchsgestaltung 119
c. Verwendetes Applikat 119
d. Nachweismethode 119
2. Ergebnisse 120
a. Probenadaptierte Standardkurve 120
b. Prämissen der Auswertung 121
c. Meßwerte und Auswertung 122
3. Diskussion und Beurteilung der Ergebnisse 125
a. Hirudinkonzentration der Salbe 125
b. Einwirkzeit der Salbe 125
c. Kritische Betrachtung der Auswertung 126
4. Zusammenfassende Beurteilung 126

ZUSAMMENFASSUNG DER GESAMTEN ARBEIT 127

ANHANG (1) Meßwert-Tabellen . . . . . I - XIV
(2) Substanzenverzeichnis . . . . . XV - XVI
(3) Geräteverzeichnis XVII
(4) Abkürzungsverzeichnis . . . . . XVIII - XIX
(5) Literaturverzeichnis . . . . . XX - XXXIII

LEBENSLAUF

EINLEITUNG

I. ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, mittels in-vivo-Versuchen Erkenntnisse über die perkutane Permeabilität der menschlichen Haut für Hirudin zu gewinnen.
Durch Anwendung eines speziellen radioimmunologischen Nachweisverfahrens für Hirudin (Radioimmunobioassay = RIBA) sollte die Frage des perkutanen Durchtritts für biologisch aktives Hirudin geklärt werden.

Die Versuche am Tiermodell (junges Hausschwein, Pavian) dienten der Vorbereitung und Ergänzung der Studien am Menschen. Insbesondere galten die Untersuchungen am Tier der Erprobung des experimentellen Procedere, der Analyse der renalen Ausscheidungsparameter für Hirudin nach intravenöser Gabe sowie der systemischen Verträglichkeit des Inhibitors.

Die durchgeführten Experimente bauen auf den vorausgegangenen Untersuchungen von STÖLZLE [138] (1982: In-vitro- und In-vivo-Studien am **Meerschweinchen**), GASTEIGER [135] (1984: In-vitro-Studie an **Schweinehaut**) und BRUCKBAUER [132] (1984: In-vitro-Studie an **Schweinehaut**, In-vivo-Studie an der **Maus**) auf.

II. CHARAKTERISIERUNG DER UNTERSUCHTEN SUBSTANZ HIRUDIN

II.1. Vorkommen

Hirudin ist Bestandteil des Biß-Sekretes des Medizinischen Blutegels (Hirudo medicinalis) und ermöglicht durch seine blutgerinnungshemmende Wirkung dem Parasiten die Blutaufnahme aus Wirts- bzw. Beutetieren, ohne daß eine Koagulation eintritt.
Anatomie, Physiologie und medizin-historische Bedeutung des Blutegels sind ausführlich dargestellt bei HERTER [110]. Neuere Untersuchungsergebnisse finden sich bei DIETL [133].

II.2. Historischer Abriß zur Gewinnung

Die Entdeckung des Hirudins geht auf HAYCRAFT [049] (1884) zurück, der - ausgehend vom blutgerinnungshemmenden Effekt des Blutegelspeichels - erste Versuche zur Isolierung des verantwortlichen Agens aus Blutegelextraktionen unternahm.
Die heutige Namensgebung >Hirudin< leitet sich sinnfällig vom Medizinischen Egel Hirudo medicinalis ab; erstmals verwendete 1904 JACOBY [052] den Begriff >Herudin<.
Nach den Versuchen von HAYCRAFT wurde eine ganze Reihe von Verfahren zur Hirudingewinnung aus Blutegelpräparationen entwickelt, denen die ersten 3 Schritte gemeinsam sind:

(1) Mechanisches Aufschließen der Blutegel (Zerkleinern etc.),

(2) Extraktion des Hirudins (z.B. mit Alkohol) einschließlich Ausfällung störender Begleitsubstanzen),

(3) Steigerung der Hirudinkonzentration im Extrakt (z.B. durch Zentrifugation, Dialyse, fraktionierte Fällungen, Gefriertrocknung).

UNIV. LEIPZIG BIBL.

II.2. Eine dataillierte Darstellung der angewandten Verfahren und die jeweiligen experimentellen Einzelheiten bietet die Übersichtsarbeit von JOPENWOLFF [136].

Die umfassendsten Beiträge zur Präparation und zum Verständnis der Hirudin-Wirkung als spezifischer Thrombin-Inhibitor lieferte MARKWARDT; stellvertretend für die Vielzahl seiner Untersuchungen seien eine Arbeit zu Beginn seiner Beschäftigung mit Hirudin (1955: >Untersuchungen über Hirudin<) [059] und eine spätere Monographie (1963: >Blutgerinnungshemmende Wirkstoffe aus blutsaugenden Tieren<) [113] genannt. Letztgenannte Schrift bietet darüberhinaus ein sehr umfangreiches Literaturverzeichnis.

Bis zur endgültigen Strukturaufklärung des Hirudins im Jahre 1984 durch DODT et al. (siehe unten) stellte die klassische Blutegelaufbereitung die Grundlage der Hirudingewinnung dar. Durch Kenntnis der Primärstruktur konnte dann damit begonnen werden, das Peptid Hirudin gentechnologisch zu produzieren (siehe Symposium >Ex Hirudine< [043]).

II.3. Physiko-chemische Charakterisierung

Hirudin ist ein relativ saures, kohlenhydratfreies **Polypeptid** und besitzt stöchiometrisch-äquimolare (1:1) Inhibitorwirkung gegenüber dem Gerinnungsenzym Thrombin.
Die Komplexbildung des Hirudins mit Thrombin erfolgt schneller als die Reaktion des Thrombins mit seinem obligaten Substrat Fibrinogen. Der Hirudin-Thrombin-Komplex ist dabei im Bereich von pH 4 bis 10 durch eine ausgeprägte Stabilität gekennzeichnet, die durch eine Dissoziationskonstante K_i von 30 - 80 pMol/l (je nach den experimentellen Bedingungen und der Art der Auswertung) beschrieben wird.

(DODT [134]; LANDIS, ZABINSKI, LAFLEUR, BING & FENTON [055]; MARKWARDT [113]; WALSMANN & MARKWARDT [093])

Eine Hemmwirkung gegenüber dem aktivierten Faktor IX wird ebenfalls diskutiert.

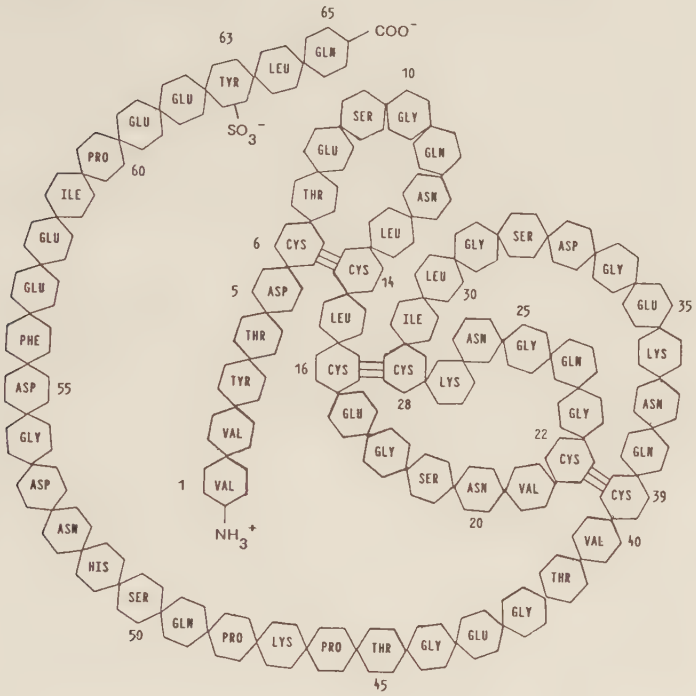
(DAVIE, FUJIKAWA, KURACHI & KISIEL [104])

Die **Primärstruktur** des Peptids Hirudin war bis in die jüngste Gegenwart Gegenstand intensiver Forschung: PETERSEN, ROBERTS, SOTTRUP-JENSEN, MAGNUSSON und BAGDY (1976) [117] ermittelten die Aminosäuresequenz des Hirudins weitgehend; DODT, MÜLLER, SEEMÜLLER und CHANG (1984) [026] gelang schließlich die eindeutige und vollständige Strukturermittlung.
Demnach besteht Hirudin aus 65 Aminosäuren. Das Molekulargewicht ergibt sich zu 7043 und der isoelektrische Punkt liegt aufgrund der in erhöhtem Maß vorkommenden Glutaminsäure- und Asparaginsäure-Reste bei 3,8 bis 4,0. Die Aminosäuren Tryptophan, Methionin, Arginin und Alanin sind im Hirudinmolekül **nicht** vertreten. Tyrosin in Position 63 weist eine Sulfatierung am phenolischen Hydroxylrest auf.

Die Darstellung der folgenden Seite zeigt die Primärstruktur des Hirudins.

(Zur Lage der Disulfidbrücken: siehe DODT, SEEMÜLLER, MASCHLER & FRITZ [027]; zur Spezifizierung der Inhibitor-Eigenschaften: siehe SEEMÜLLER [137])

Aminosäuresequenz des Hirudins (nach DODT [234])



Legende: Disulfidbrücke

AMINOSÄUREN:

ASN = Asparagin
ASP = Asparaginsäure
CYS = Cystein
GLN = Glutamin
GLU = Glutaminsäure
GLY = Glycin
HIS = Histidin
ILE = Isoleucin
LEU = Leucin
LYS = Lysin
PHE = Phenylalanin
PRO = Prolin
SER = Serin
THR = Threonin
TYR = Tyrosin
VAL = Valin

II.4. Einheiten zur Hirudin-Quantifizierung

II.4.a. Enzymatische Messung

Die stöchiometrische Reaktion des Hirudins mit Thrombin bietet sich als Grundlage einer enzymatischen Quantifizierung von Hirudin-Aktivitäten an.

ATE-Messung

1 ATE (Anti-Thrombin-Einheit) **stellt diejenige Hirudinquantität dar, die 1 NIH-E** (Thrombin-Einheit, definiert durch das amerikanische National Institute of Health) **vollständig zu inhibieren vermag.**

Die Thrombin-Einheit NIH-E wiederum ist dabei in Bezug auf dessen spezifisches Substrat Fibrinogen definiert, und zwar als diejenige Menge Thrombin, die bei 28°C 1 ml einer standardisierten Fibrinogenlösung innerhalb 15 s koaguliert.

IU-Messung

Legt man bei der Auswertung der stöchiometrischen Hirudin-Thrombin-Reaktion nicht die NIH-Einheit als Maß der Thrombinaktivität zugrunde, sondern bezieht man auf die Enzym-Einheit 1 U (Unit) als Meßparameter, so lautet die Definition sinngemäß:

1 IU (Inhibitor-Unit) **Hirudin stellt diejenige Hemmaktivität dar, die 1 U** (Unit) **Thrombin vollständig zu inhibieren vermag.**

Die Enzym-Einheit 1 U ist dabei definiert als diejenige Enzymmenge (hier: Thrombin; z.B. Test-Thrombin vom Rind; BEHRING, Marburg), die 1 µmol Substrat (hier z.B.: Chromozym TH; BOEHRINGER, Mannheim) unter den festgelegten Bedingungen (siehe Testanweisung) in einer Minute umsetzt.

Umrechnung der Aktivitätseinheiten ATE und IU

Nach GASTEIGER[135] und auch BRUCKBAUER[132] ist folgende Beziehung anzusetzen:

1 ATE ≙ 0,033 IU
1 IU ≙ 30,3 ATE

Entsprechung von Masse- und Aktivitäts-Einheiten

Unter Zugrundelegung der Beziehung 1 mg Hirudin ≙ 20000 ATE gilt:

1 µg ≙ 20 ATE
1 ATE ≙ 0,050 µg

1 µg ≙ 0,66 IU
1 IU ≙ 1,515 µg

II.4.b. Radioanalytische Messung

Die radioanalytische Messung mit dem Radioimmunobioassay (RIBA) nach DODT[134] fußt zwar auch auf der Enzym-Inhibitor-Reaktion von Hirudin mit Thrombin; durch die Auswertung der gemessenen Count-Zahl über Eichkurven (siehe Seite 6/7) ist jedoch eine **Mengenangabe für Hirudin in Nanogramm** möglich.

III. MEDIZINISCHE BEDEUTUNG DES HIRUDINS

III.1. Diagnostische Anwendung

Die äquimolare Reaktion von Hirudin mit Thrombin ermöglicht quantitative gerinnungsphysiologische Untersuchungen. Mögliche Tests und deren experimentelle Durchführung sind bei MARKWARDT [113] ausführlich dargestellt.
Hier seien die in-vitro-Assays nur kurz genannt:

- **Thrombinbestimmung** durch Titration mit Hirudin.
- **Prothrombinbestimmung** (indirekt über die Thrombinbestimmung), in standardisierter Form als sog. **Hirudin-Test** zur Kontrolle der Antikoagulantien-Therapie.
- **Hirudin-Toleranz-Test** zur Differentialdiagnose von Gerinnungsstörungen.

In der hämatologischen Routinediagnostik spielen diese Tests heute keine Rolle, da ein breites Spektrum anderer potenter Verfahren zur Verfügung steht (BARTHELS & POLIWODA [103], 1980).

Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß bei einer systemischen therapeutischen Anwendung von Hirudin (siehe Seite VII) diese Substanz auch in der hämatologischen Labordiagnostik wieder Bedeutung erlangen wird.

III.2. Therapeutische Anwendung

III.2.a. Topisch

Die Entwicklung der Blutegeltherapie, beginnend mit dem Ansetzen des Parasiten beim Patienten, bis hin zur Applikation gereinigter und galenisch aufbereiteter Extrakte, ist ausführlich dargestellt im Übersichtsartikel von STRÜMPER [090] (1963/4) als auch bei HERTER [110].

Ausgehend vom historischen Ansatz der Blutegeltherapie wird heute die Wirksubstanz Hirudin in äußerlicher Anwendung bei diversen Erkrankungen des Integuments einschließlich seiner tieferen Schichten, der Gefäße und des Stütz- und Bindegewebes empfohlen.

Therapeutisch-kausal betrachtet hat die Hirudinanwendung dabei folgende Ziele:

- Die Verbesserung der intravasalen Rheologie durch Vermeidung von Mikrothromben, Minderung der Thrombozytenaggregation (DIETL [133]) und möglicherweise Hemmung weiterer Gerinnungsfaktoren außer Thrombin (vgl. Seite II).
- Die verbesserte Resorption von Hämatomen aufgrund des Thrombin-Antagonismus.
- Die Reduktion entzündlicher Vorgänge durch das antiphlogistische Potential.

Eine Auflistung bislang beschriebener Indikationen für Hirudin in topischer Applikationsform wird im folgenden ohne bewertende Stellungnahme wiedergegeben:

- **Stumpfe Traumen** (mit Hämatombildung)
- **Phlebitis, Thrombophlebitis und Thrombose** des oberflächlichen Venensystems der unteren Extremität
  - idiopathisch bzw. bei Varikosis
  - posttraumatisch
  - postoperativ
  - nach Varizenverödung
- **Varikosis** (auch mit sekundärer Entzündung, siehe oben)
- **Ulcus cruris**
- **Infusionsphlebitis**
- **Tendovaginitis**
- **Entzündliche Infiltrate** (z.B. Furunkel, Karbunkel)
- **Juvenile Akne**
- **Kälteschäden** (leichteren Grades)
- **Narbenbeschwerden** (Förderung der Elastizität des Narbengewebes)

Es existiert eine ganze Reihe von Studien, Einzelbeobachtungen und Fallbeschreibungen zur Therapie-Effizienz von Hirudinpräparaten bei den genannten Indikationen. Rein orientierend, ohne Anspruch auf Vollständigkeit, werden im folgenden einige Arbeiten zitiert:

1957 BRANDIS & ROTHE [015]
> Behandlungsmöglichkeiten mit Exhirud, einem Nativ-Blutegelvollsekret-Präparat <

1963 GOLLNICK [044]
> Zur Behandlung des Status varicosus <

1963 RINGSHAUSEN [079]
> Ein Beitrag zur Behandlung von Erfrierungen <

1965 WESENER [094]
> Behandlung der oberflächlichen Thrombophlebitis <

1967 WESENER [095]
> Zur Diagnose und Therapie der oberflächlichen Thrombophlebitis (Varicophlebitis) in der Sprechstunde <

1967 ZETTEL [100]
> Beobachtungen über Exhirud-Salbe bei der Behandlung der Akne vulgaris <

1969 TRONNIER [091]
> Weitere experimentelle Untersuchungen zur Wirksamkeit einer hirudinhaltigen Salbe <

1970 REINHARD & FRANK [078]
> Klinisch-experimentelle Untersuchungen zur Wirkung hirudinhaltiger Externa <

1971 DEUSER [024]
> Über Behandlungsmethoden von Distorsionen, Kontusionen und Hämatomen im Sportgeschehen <

1973 MITTELSTAEDT [065]
> Weitere klinisch-experimentelle Untersuchungen zur Wirkung hirudinhaltiger Externa <

1979 STOCK, DIEZEMANN, ELL & GOLLSTEIN [088]
> Bringt die lokale Blutegelwirkstoffapplikation in Salbenform Vorteile für die Mobilisierung operierter Gelenke ? <

III.2.a. Bei diesen Arbeiten handelt es sich durchwegs um klinische Erhebungen. Bisher wurde der biochemische Nachweis des perkutanen Durchtritts von Hirudin beim Menschen in vivo noch nicht geführt.

Es soll darauf hingewiesen werden, daß nicht alle von der pharmazeutischen Industrie angebotenen Präparate, die in ihrem Namen den Wortstamm -hirud- enthalten oder für ein analoges Indikationsspektrum empfohlen werden, tatsächlich Hirudin als wesentlichen Wirkstoff enthalten. In der Regel sind es Zubereitungen mit Heparin oder Heparinoiden.

Die Firma PLANTORGAN, Bad Zwischenahn, bietet in ihrer Produktreihe > Exhirud < echte **Hirudin**-Präparationen an, die den Vorteil einer Standardisierung nach Anti-Thrombin-Einheiten (ATE) besitzen.
Darüberhinaus ist derzeit kein weiterer Anbieter bekannt, der Produkte eines standardisierten Hirudingehaltes vertreibt.

III.2.b. Systemisch

Hirudin bietet sich aufgrund seines spezifischen Thrombin-Antagonismus auch für eine systemische Anwendung an.
Denkbare Indikationen (z.B. bei Hyperkoagulopathien, insb. der DIC; bei der Hämodialyse etc.) lassen sich aus bisherigen Studien ableiten:

1928 HAAS [046]
> Über Blutwaschung <

1956 MARKWARDT [060]
> Die antagonistische Wirkung des Hirudins gegen Thrombin in vivo <

1965 HAUSTEIN & MARKWARDT [048]
> Über den Einfluß von Hemmstoffen der Blutgerinnung und Fibrinolyse auf das SANARELLI-SHWARTZMANN-Phänomen <

1971 MARKWARDT & LANDMANN [114]
Versuche zur Verhinderung der Ausbildung experimentell provozierter Gerinnungsthromben durch die prophylaktische Gabe von Hirudin

1973 KÖSTERING, KÖNIG, KOSITZKI, RIESENKAMP & HAUNSCHILD [054]
> Thrombenbehandlung durch Hirudin <

1982 MARKWARDT, HAUPTMANN, NOWAK, KLESSEN & WALSMANN [061]
> Pharmacological Studies on the Antithrombotic Action of Hirudin in Experimental Animals <

III.2.c. Ausblick zur systemischen Anwendung

Die systemische Anwendung von Hirudin erfolgte bislang nahezu ausschließlich experimentell.

Neuere Untersuchungen zur vasalen Verträglichkeit und Beeinflussung der Blutgerinnung durch Hirudin beim Menschen stammen von BICHLER, DODT, GEMMERLI und SEEMÜLLER (1984/5; bisher unveröffentlicht).

Weitere Studien betreffen den Einsatz von Hirudin (auch zusammen mit dem Blutegelwirkstoff Eglin) bei septischen Schockzuständen (tierexperimentelle Arbeiten von SIEBECK & HOFMANN, 1985/6; bisher unveröffentlicht).

Die Ergebnisse dieser u.a. Studien werden zeigen, ob dem Hirudin neben der klassischen lokalen Anwendung systemische Indikationen in der Hämotherapie einschließlich der Dialyse und in der Intensivmedizin zugewiesen werden können.

*

DIE METHODE DES RADIOIMMUNOBIOASSAY (=RIBA) ZUM SENSITIVEN NACHWEIS BIOLOGISCH AKTIVEN HIRUDINS

A. NOTWENDIGKEIT DES RIBA 1

I. SENSITIVITÄT RADIOIMMUNOLOGISCHER VERFAHREN . . 1

II. NACHWEIS DER BIOLOGISCHEN AKTIVITÄT 2

III. VORTEILE BEI HUMANVERSUCHEN 2

B. BESCHREIBUNG DER METHODE 2

I. VORBEMERKUNG 2

II. PRINZIP 3

III. VERSUCHSDURCHFÜHRUNG 5

IV. ERSTELLUNG VON STANDARD-EICHKURVEN UND MESSWERT-BENENNUNG . 6

V. ANWENDUNG 8

C. PROBENVORBEREITUNG 8

I. VORVERSUCHE ZUR PROBENAUFARBEITUNG MITTELS SEP-PAK-C 18-KARTUSCHE . . 8

1. Adsorptionsfähigkeit für Hirudin 9

2. Eluierung des Hirudins 9

3. Fraktionierte Eluierung 10

4. Wiederverwendbarkeit der Kartusche 11

II. OPTIMIERUNG DER PROBENVORBEREITUNG UND NULLWERT-KONTROLLE . 11

1. Verwendete Puffer und Protektorsubstanzen bei der Urinproben-Vorbereitung . . 12

2. Urinproben-Vorbereitung 13

a. Proben mit hohem Hirudingehalt 13

b. Proben mit sehr hohem Hirudingehalt 14

c. Proben mit niedrigem Hirudingehalt 14

3. Gewebsproben-Vorbereitung 17

a. Verwendete Puffer 17

b. Durchführung 17

D. PROBENADAPTIERTE STANDARD-EICHKURVEN 20

I. URIN-STANDARDKURVEN 20

Typ I: Bei hohem und sehr hohem Hirudingehalt . . . 20

Typ II: Bei niedrigem Hirudingehalt 20

II. HAUTGEWEBE-STANDARDKURVEN 22

E. FEHLERBETRACHTUNG UND NACHWEISGRENZEN DES RIBA . . 23

I. FEHLERBETRACHTUNG 23

1. Variationskoeffizienten 23

a. Inter-Assay-Variationskoeffizient 23

b. Intra-Assay-Variationskoeffizient 23

2. Graphische Auswertung der Assay-Varianzen 23

a. Inter-Assay-Varianz 23

b. Intra-Assay-Varianz 23

3. Störfaktoren der Nachweismethodik 26

a. Urinproben 26

b. Hautgewebsproben 26

II. NACHWEISGRENZEN DES RIBA 26

1. Verdünnungsfaktor - Anreicherungsfaktor 26

a. Urinproben 26

b. Hautgewebsproben 26

2. Bedeutung der Standard-Eichkurven 26

3. Probenspezifische Nachweisgrenzen 27

a. Urinproben 27

b. Hautgewebsproben 27

F. STABILITÄTSNACHWEIS FÜR HIRUDIN 28

I. DATEN DER LITERATUR ZUR HIRUDINSTABILITÄT . . . 28

II. STABILITÄT VON HIRUDIN IN LYOPHILISATEN UND IN URIN . 28

1. Während der Lagerung als Lyophilisat 28

2. In Human-Urin während der Lagerung bei -20°C . . . 30

3. Bei Erwärmung auf 31

a. +60°C für 60 min 31

b. +80°C für 15 min 31

III. HIRUDIN-STABILITÄT IN EXTRAKTEN VON HAUTGEWEBSPROBEN 32

A. NOTWENDIGKEIT DES RIBA

Ziel unserer Untersuchungen war es, Hirudin in tierischen und menschlichen Urin- und Gewebsproben in biologisch aktiver Form zuverlässig nachweisen zu können.

Aufgrund der Verteilung des hydrophilen Hirudins in allen Kompartimenten des Körpers mit bevorzugt wässriger Phase sowie wegen seiner schnellen renalen Elimination (MARKWARDT [113]) mußte in den Analyseproben mit sehr geringen Hirudinkonzentrationen gerechnet werden.

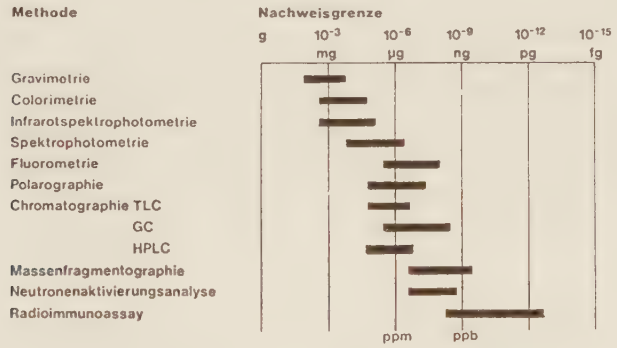
Es galt demnach ein Nachweisverfahren auszuwählen, das imstande ist, Hirudin in sehr geringen Mengen zu detektieren. Eine weitere Forderung bestand darin, Hirudin nicht allein als chemisch inerte Substanz oder Antigen zu bestimmen, sondern es sollte eine Aussage über seine biologische Aktivität in der betreffenden Probe getroffen werden können.

I. SENSITIVITÄT RADIOIMMUNOLOGISCHER VERFAHREN

Nach SACHS [121] ist die **Sensitivität (= Empfindlichkeit)** definiert als der **geringste auffindbare Wert, der sich signifikant von Null unterscheidet.**

Auf die besondere Leistungsfähigkeit radioimmunologischer Verfahren in Bezug auf die Sensitivität machten bereits 1979 STRECKER, HACHMANN und SEIDEL[089] in ihrer Arbeit über den klassischen Radioimmunoassay (RIA) aufmerksam.

Abb. 1: Vergleich der Sensitivität unterschiedlicher Verfahren



(Entnommen aus: STRECKER, HACHMANN und SEIDEL; a.a.O.; S.54)

Diesen Vorteil der hohen Sensitivität der Radioanalytik besitzt auch der in den Versuchen angewandte Radioimmunobioassay (RIBA), der einem modifizierten Radioimmunoassay (siehe B.II., Seite 3 f) entspricht und deshalb den Hirudinnachweis im Nanogramm-Bereich ermöglicht.

II. NACHWEIS DER BIOLOGISCHEN AKTIVITÄT

Enzymatische Nachweisverfahren für Hirudin genügen nicht den gestellten Anforderungen im Hinblick auf die Sensitivität, da deren untere Nachweisgrenze bedingt durch die photometrische Messung im Mikrogramm-Bereich liegt (vgl. Abb. 1, Seite 1).

Die alleinige Markierung des applizierten Hirudins mit einem radioaktiven Marker und Messung der eliminierten respektive gespeicherten Radioaktivität oder die Anwendung der klassischen immunologischen Verfahren wie RIA oder ELISA erlauben keine Aussage über die biologische Integrität des markierten Hirudins auf seinem Weg durch den Organismus bis zur Speicherung im untersuchten Gewebe bzw. bis zu seiner Ausscheidung im Urin.

Der Radiobioassay (= RIBA) vereinigt die Vorteile des Prinzips der **RADIOANALYTIK** (mit Antigen-Antikörper-Reaktion) und **ENZYMANALYTIK** (mit Enzym-Inhibitor-Reaktion) in einer kombinierten Nachweismethode. Die Erfassung der biologischen Aktivität des Hirudins erfolgt dabei über die Komplexierung mit seinem natürlichen Zielenzym Thrombin unter Bildung eines Enzym-Inhibitor-Komplexes. In diesem Hirudin-Thrombin-Komplex sind die katalytischen Funktionen des Thrombins vollständig inhibiert; eine enzymatische Spaltung natürlicher (z.B. Fibrinogen) oder synthetischer (z.B. Tosyl-Glycin-Prolin-Arginin-p-Nitroanilid = Chromozym TH) Substrate kann nicht mehr erfolgen.

Die Kopplung der beiden Methoden erlaubt zum einen die hochsensible Substanzmengenmessung und zum anderen den gleichzeitigen Nachweis ihrer biologischen Aktivität.

III. VORTEILE BEI HUMANVERSUCHEN

Neben Sensitivität und biologischem Aktivitätsnachweis bietet der RIBA den Vorteil eines in-vitro-Testes, und es entfällt somit die bei vielen radiochemischen Untersuchungen nötige Belastung des Versuchsindividuums mit radioaktiven Markern, was im Falle der menschlichen Probanden erhebliche Probleme aufgeworfen hätte.

So hingegen konnte die Versuchsdurchführung tracerfrei ausgeführt werden und die radioaktive Markierung erfolgte erst im Rahmen der Probenauswertung.

B. BESCHREIBUNG DER METHODE

I. VORBEMERKUNG

Die im Abschnitt A skizzierte Methode des RIBA stand zu Beginn der Experimente bereits in ausgearbeiteter Form zur Verfügung. Auf die Vorkehrungen, die nötig sind, um das Verfahren auf Probenmaterial biogener Natur wie Urin und Hautgewebe anwenden zu können, wird im Abschnitt C (Seite 8 ff) eingegangen.

Hier soll der RIBA nur insoweit erläutert werden, als dies für die Diskussion und Interpretation der Meßwerte vonnöten ist; bezüglich Ausarbeitung, Optimierung und Einzelheiten des Verfahrens wird auf die Originalarbeit von DODT[134] verwiesen.

II. PRINZIP

In der Grundkonzeption handelt es sich um einen modifizierten Radioimmunoassay; die **Besonderheit** liegt darin, **daß der Antigen-Antikörper-Reaktion eine Enzym-Inhibitor-Reaktion vorgeschaltet ist.**

Die Kombination der zwei Reaktionstypen geschieht im RIBA auf folgende Art:

(1) Das **ANTIGEN** der Antigen-Antikörper-Reaktion ist **identisch mit dem ENZYM** (= Human-α-Thrombin) der Enzym-Inhibitor-Reaktion

und

(2) nicht das Antigen ist **Träger der radioaktiven Markierung** (wie im klassischen Radioimmunoassay), sondern **der INHIBITOR** (= Hirudin) der vorgeschalteten Enzym-Inhibitor-Reaktion.

Die gemessene Radioaktivität erlaubt somit über geeignete Eichkurven eine Mengenaussage über vorhandenes Material **mit** thrombinhemmender Aktivität. Zu beachten ist dabei:

- Entsprechend der Anlage des Testes wird Hirudin, das seine Inhibitor-Eigenschaft gegenüber Thrombin verloren hat, **nicht** erfaßt.

  Auf dieses Charakteristikum der Methode, ausschließlich biologisch aktives Material zu registrieren, weist die Namensgebung in Form von RADIOIMMUNOBIOASSAY hin.

- Neben Hirudin werden auch andere Substanzen mit thrombinhemmender Aktivität (z.B. Antithrombin III) erfaßt, was zur Vortäuschung eines erhöhten oder nicht vorhandenen Hirudingehaltes führen kann.

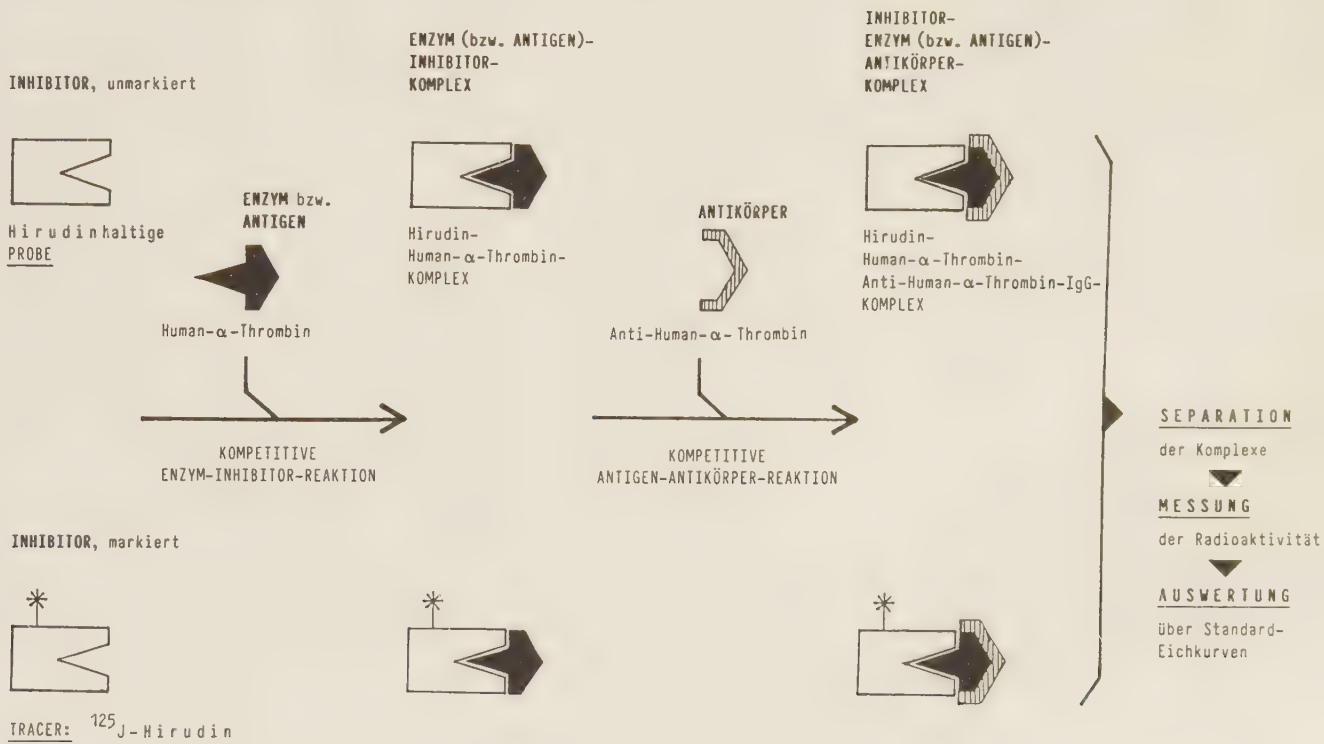
  Da aber der Gehalt der verwendeten Probenmaterialien an nicht-Hirudin-bedingter Antithrombin-Aktivität normalerweise sehr gering ist, kann davon ausgegangen werden, daß die im RIBA gemessene Radioaktivität im Rahmen der Meßgenauigkeit des Testes (siehe Abschnitt E) und über den Weg der probenadaptierten Standard-Eichkurven (siehe Abschnitt D) ein Maß für die tatsächlich in der Probe vorhandene Hirudinmenge darstellt.

Die Abb. 2 der nächsten Seite zeigt eine schematische Darstellung des Radioimmunobioassay.

Symbol-Legende zur Abb. 2:

SYMBOL:					
KLASSIFIZIERUNG:	INHIBITOR unmarkiert	INHIBITOR markiert	ANTIGEN unmarkiert	ANTIGEN markiert	ANTIKÖRPER
FUNKTION IM RIBA:	Probe	Tracer	ENZYM	nicht vorhanden	ausfällender AK
SUBSTANZ IM RIBA:	Hirudin	^{125}J-Hirudin	Human-α-Thrombin	---------	Anti-Human-α-Thrombin-IgG

Abb. 2: Radioimmunobioassay (RIBA) nach DODT [134]



III. VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

Zum Einsatz im RIBA gelangen aus Gründen der Standardisierung stets 100 µl Probenvolumen, sei das Probenmaterial nun Urin oder Hautgewebeextrakt, wobei sich die Probenvorbereitung am Erwartungswert des Hirudingehaltes orientieren muß. Die Schritte, die nötig sind, um in 100 µl Probenvolumen stets eine im Meßbereich liegende Hirudinmenge vorzufinden, sind unter Abschnitt C beschrieben.

Ablauf des RIBA

(Bezüglich Herkunft der Reagenzien, Zusammensetzung der Puffer und Arbeitsanweisungen wird auf die Originalarbeit von DODT[134] verwiesen.)

(1) 100 µl Probenvolumen werden in EPPENDORF-RIA-Tubes gegeben. Dies erfolgt:

(a) **bei Urinproben hohen Hirudingehaltes** (0,2-1,6 ng Hirudin/100 µl Urin) durch Verwendung von 100 µl der Urinprobe;

(b) **bei Urinproben sehr hohen Hirudingeh.** (> 1,6 ng Hirudin/100 µl Urin) durch Verwendung von jeweils 100 µl verschiedener Verdünnungsstufen der Urinproben;

(c) **bei Urinproben niedrigen Hirudingeh.** (< 0,2 ng Hirudin/100 µl Urin) durch Aufnahme des am Schluß der Aufarbeitung erhaltenen Lyophilisates in 100 µl STD-Puffer;

(d) **bei Hautgewebsproben** ebenfalls durch Aufnahme des am Schluß der Aufarbeitung erhaltenen Lyophilisates in 100 µl STD-Puffer.

(2) Zugabe von jeweils 100 µl ^{125}J-Hirudin-Lösung (**Tracer**) einer spezifischen Radioaktivität von 19,5 ± 1,3 µCi/µg Protein in einer Verdünnung, sodaß sich ca. 16500 cpm/100 µl ergaben.

(3) Zugabe von jeweils 100 µl Human-α-Thrombin-Lösung einer Konzentration von 0,35 mU/100 µl zum Gemisch aus (1)+(2). (Die Aktivitätsbestimmung wurde mit dem Chromozym TH-Test durchgeführt.)

(4) Inkubation des Gemisches aus (1)+(2)+(3) für 15 min bei 25°C.

(5) Komplexfällung durch Zugabe von jeweils 100 µl Anti-Human-α-Thrombin vom Kaninchen (**1. Antikörper**) in der 1 : 2000-Verdünnung der Stammlösung.

(6) Inkubation des Gemisches aus (4) und (5) für 16-24 h (über Nacht) bei 25°C.

(7) Zugabe von jeweils 100 µl Anti-Kaninchen-IgG vom Esel (**2. Antikörper**) in der 1 : 25-Verdünnung der Stammlösung sowie von jeweils 500 µl 6%igem **P**olyethylen**g**lykol-(=**PEG**)-Puffer zur verbesserten Fällung der Antigen-Antikörper-Komplexe.

(8) Zentrifugieren für 30 min und Absaugen des Überstandes (der bei den Reaktionen nicht verbrauchten Substanzmengen).

(9) Messung der Radioaktivität des Präzipitats im γ-Counter.

(10) Auswertung der gemessenen Zählraten über Standard-Eichkurven (siehe Abschnitt D, Seite 20 ff).

Anmerkungen: Aus statistischen Gründen wird von jeder Probe eine Dreifachbestimmung mit identischem Probenansatz durchgeführt.

Die Zugabe eines 2. Antikörpers und des PEG-Puffers stellt keine grundsätzliche Eigentümlichkeit des RIBA dar, sondern ist eine vielfach geübte Praxis bei radioimmunologischen Methoden.

IV. ERSTELLUNG VON STANDARD-EICHKURVEN UND MESSWERTBENENNUNG

Da die gemessene Zahl an Counts eine aus den kompetitiven Reaktionen des RIBA gewonnene Größe und keine absolute Mengenangabe darstellt, ist es nötig, zur Quantifizierung des nachgewiesenen Hirudins Eichkurven zu erstellen.

Von einer Hirudin-Stammlösung mit einem Hirudingehalt von 5 µg/ml (bestimmt durch Aminosäureanalyse) wird eine genügend große Zahl von 200 µl-Aliquoten bei -20°C aufbewahrt. Zur Erstellung der Eichkurve wird jeweils ein Aliquot aufgetaut und mit 1800 µl Standardpuffer (= STD-Puffer) aufgenommen, wodurch sich ein Gehalt von 0,5 µg/ml ergibt. Von dieser Ausgangslösung wird mit STD-Puffer eine 1:1-Verdünnungsreihe nachstehender Art angesetzt.

Lösung:		Hirudingehalt [ng Hirudin pro 100 µl Lösung]
Stammlösung:		500,000
Ausgangslösung:		50,000
1:1-Verdünnungsreihe:	1	25,000
	2	12,500
	3	6,250
	4	3,125
	5	1,563
	6	0,781
	7	0,391
	8	0,195
	9	0,098
Verdünnungsstufe	10	0,049

Wegen der sigmoiden Verlaufsform der Eichkurve (siehe Abb. 3, Seite 7) finden die Verdünnungsstufen 1 und 2 lediglich zur Herstellung der Verdünnungsreihe Verwendung.

Zur Erstellung der Standard-Eichkurven im STD-Puffer werden von den Verdünnungsstufen 3 bis 10 jeweils 3 x 100 µl (identische Dreifachbestimmung) analog der in Abschnitt B.III unter (1)(a) beschriebenen Weise im RIBA eingesetzt.

Die vom γ-Counter registrierten **Proben-Zählraten B** müssen nun nach Abzug der allgemeinen **Grundaktivität N** in Beziehung gesetzt werden zur **Zählrate B_o** der gemessenen Aktivität bei Einsetzen **einer Leerprobe ohne Hirudin**; in diesem Fall erfolgt die Bindung des Tracers 125-J-Hirudin ausschließlich an das Enzym bzw. Antigen Human-α-Thrombin.

Die prozentuale Bindung p nach der Formel

$$p = \frac{B - N}{B_o - N} \times 100 \; [\%]$$

stellt das Maß für die vorhandene Hirudinmenge dar.

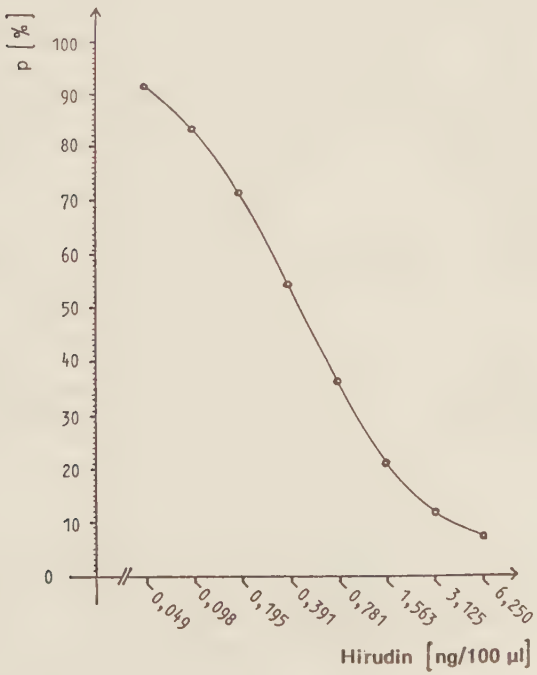
Dabei ist zu beachten, daß aufgrund der Testdurchführung die Zahlengrößen der prozentualen Bindung p und der vorhandenen Menge an Hirudin gegenläufig sind, das heißt:

Hohe Prozentzahlen entsprechen geringen Hirudinmengen und umgekehrt.

Infolge Kenntnis der im Test eingesetzten Hirudinmengen lassen sich nunmehr über eine Eichkurve die prozentuale Bindung p und die in einem Testansatz vorliegende Hirudinmenge in Nanogramm sowohl graphisch als auch rechnerisch (über Regressionsrechnung im linearen Teil der Kurve) korrelieren. Es resultiert bei halblogarithmischer Darstellung eine sigmoide Kurve; die Abb. 3 zeigt hierfür ein Beispiel.

Abb. 3: **Korrelation von prozentualer Bindung p und Hirudinmenge (in ng/100 µl Testansatz) beim RIBA in einer Standard-Eichkurve im STD-Puffer**

(Kurve vom 19.12.83)



V. ANWENDUNG

Es sollte folgendes biologische Probenmaterial auf den Gehalt an Hirudin getestet werden:

Probengruppe Urin von Mensch
Pavian
Schwein

Probengruppe Gewebe (jeweils Haut) von Mensch
Schwein

Da die Methodik des RIBA für die Analyse eines 100 µl-Probenvolumens (STD-Puffer mit variablem Hirudingehalt) entwickelt worden war, mußte zuerst geprüft werden, ob sich das Nachweisverfahren auch für den Einsatz anderer Probenvolumina und Probenmaterialien eignet.

Vor allem sind Störgrößen zu eliminieren wie hoher Lipidgehalt der Probe, Schwebepartikel im Testansatz sowie proteinadsorptive Wandaktivitäten von Probengefäßen; darüberhinaus sind Störmöglichkeiten durch enzymatische und mikrobielle Aktivitäten zu berücksichtigen, die bereits in der Vorbereitungsphase des Testes eine proteolytische Zerstörung oder anderweitige Inaktivierung von Hirudin bewirken können.

C. PROBENVORBEREITUNG

I. VORVERSUCHE ZUR PROBENAUFARBEITUNG MITTELS SEP-PAK-C 18-KARTUSCHE

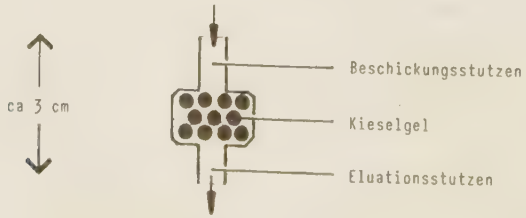
Um die Forderung nach genügender Reinheit des Hirudins in den zu testenden Proben zu erfüllen, galt die Suche zunächst einem möglichst schonenden Filtrier- und Konzentrierungssystem.

Aus der Vielzahl der angebotenen Systeme wurde die SEP-PAK-C 18-Kartusche der Firma WATERS ausgewählt und in Vorversuchen auf ihre Brauchbarkeit getestet.

Unter der Voraussetzung, daß sich die C 18-Kartusche sowohl bei Beladung im Nanogramm- als auch im Mikrogramm-Bereich gleich verhält (dies wurde durch RIBA-Messung bestätigt), wurden die Vorversuche im Mikrogramm-Bereich mittels Hirudin-Messung durch den Chromozym-TH-Test (biologische Aktivitätsmessung) der Firma BOEHRINGER durchgeführt. Dies ersparte die aufwendigere radioimmunologische Messung.

Bei der SEP-PAK-C 18-Kartusche handelt es sich um eine Kieselgelsäule, die vom Hersteller als Einmalsäule angeboten wird, nach unseren Erfahrungen aber durchaus - je nach Beschickungsgut und bei entsprechenden Spülschritten - bis zu ca. 20 mal wiederverwendet werden kann.

Abb. 4: SEP-PAK-C 18-Kartusche^{R} der Firma WATERS



Das Prinzip der Kartusche beruht auf der Adsorption niedermolekularer Peptide (also auch des Hirudins) an der Matrix der Kieselgelfüllung, auf der Durchlässigkeit für organische und anorganische Begleitstoffe der Beschickungslösung (z.B. Salze, Harnstoff, Pigmente etc.) und der gezielten Ablösbarkeit der adsorbierten Substanz durch Eluierung mit geeigneten Lösungsmitteln.

Die Vorversuche galten der Prüfung folgender Parameter der C 18-Kartusche in Bezug auf Hirudin:

- Durchlässigkeit für Hirudin bei der Beschickung
- Eluierbarkeit von Hirudin aus der Kartusche durch verschiedene Lösungsmittel (Wasser, Methanol, Acetonitril)
- Fraktionierte Eluierbarkeit des Hirudins
- Wiederverwendbarkeit der Kartusche nach geeigneten Spülschritten

I.1. Adsorptionsfähigkeit für Hirudin

Versuchsansatz: Die C 18-Kartusche wurde mit einer jeweils definierten Hirudinmenge (mit Hirudin-Standard versetzter Humanurin) beschickt. Das Beschickungsvolumen betrug stets 5 ml. Die aus dem Eluationsstutzen austretende Lösung (sog. Direkteluat) wurde aufgefangen, deren Menge registriert sowie der Hirudingehalt im Chromozym TH-Test bestimmt.

Auswertung: Die Gesamtmenge Hirudin, mit der die Kartusche beschickt wurde, bildete den Ausgangswert von 100 %. Die im Direkteluat gefundene Hirudinmenge wurde hierzu in Bezug gesetzt.

Ergebnis: Im Direkteluat fanden sich in verschiedenen Versuchsreihen 4,4 % bzw. 3,7 % bzw. 0,1 % des eingesetzten Hirudins; die C 18-Kartusche retiniert also 95,6 - 99,9 % der aufgebrachten Hirudinmenge.

I.2. Eluierung des Hirudins

Versuchsansatz: Analog zu oben wurde die Kartusche beschickt; als Eluationsmittel (Volumen stets 5 ml) für die Ablösung des adsorbierten Hirudins von der Kieselgelmatrix der C 18-Kartusche dienten:

- Aqua dest.
- Wäßriges Methanol: 10, 20, 30, 40 und 50%ig
- Wäßriges Acetonitril: 50%ig

Auswertung: Analog zu oben wurden die im Eluat bestimmten Hirudinmengen prozentual auf die Gesamt-Beschickungsmenge bezogen.

Ergebnisse:

- **Aqua dest.** zeigte keine signifikante Eluations-Potenz
- **Methanol** führte zu folgenden Eluationsmengen:

  10%-/ 20%-/ 30%ig: Kein Hirudin eluiert
  40%ig: 6 % Hirudin
  50%ig: 28 % Hirudin

  Auf die Anwendung von über 50%igem Methanol wurde verzichtet, da hierbei Schädigungen des Hirudins nicht auszuschließen sind.

- **50%iges Acetonitril** bewirkte eine Eluation von insgesamt 87,8 % Hirudin (vgl. Abschn. I.3, folgende Seite).

I.3. Fraktionierte Eluierung

Versuchsansatz: Die analog I.1. (Seite 9) beschickte C 18-Kartusche wurde mit 50%igem wäßrigen Acetonitril eluiert, und zwar in 10 Schritten zu je 0,5 ml. Jede Eluationsportion wurde separat auf ihren Hirudingehalt getestet.

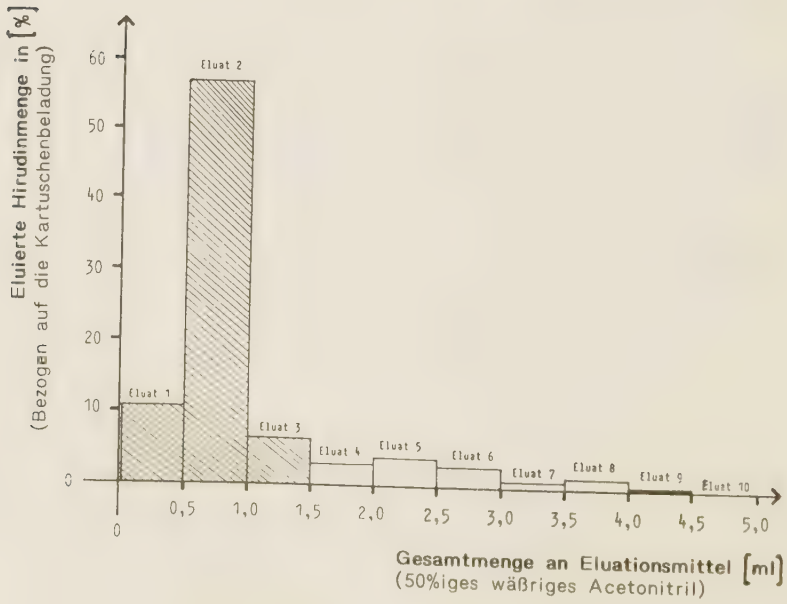
Auswertung: Siehe oben

Ergebnisse:

Eluat:	Eluierte Hirudinmenge [%] :	
1	11,4	75,5
2	57,7	
3	6,4	
4	2,8	12,3
5	4,1	
6	2,9	
7	1,1	
8	1,3	
9	0,1	
10	kein Hirudin meßbar	

Nach stufenweiser Eluation mit insgesamt 1,5 ml 50%igem wäßrigen Acetonitril sind 75,5 % des an die Kartuschenmatrix adsorbierten Hirudins abgelöst.
Durch Spülung mit weiteren 3,5 ml Eluationsmittel lassen sich noch weitere 12,3 % des Hirudins gewinnen, d.h. insgesamt werden 87,8 % des aufgetragenen Hirudins eluiert.

Abb. 5: Eluationsverhalten von Hirudin an der SEP-PAK-C 18-Kartusche von WATERS bei Eluation mit 50%igem wäßrigen Acetonitril



I.4. Wiederverwendbarkeit der Kartusche

Die unter I.1 bis I.3 dargestellten Ergebnisse wurden sowohl unter Verwendung neuer Kartuschen als auch unter Wiederverwendung gebrauchter Kartuschen nach Spülung mit 50%igem wäßrigen Acetonitril und 100%igem Methanol erzielt.
Signifikante Unterschiede zwischen neuen und wiederverwendeten (bis zu 20 mal) Kartuschen waren nicht festzustellen.

ZUSAMMENFASSUNG:

1. Die C 18-Kartusche adsorbiert 95,6-99,9 % des Hirudins, wenn sie mit einer hirudinhaltigen Lösung beschickt wird.
2. 50%iges wäßriges Acetonitril vermag adsorbiertes Hirudin besser von der Kartusche abzulösen als Aqua dest. oder Methanol bis 50%ig in wäßriger Mischung.
3. Eine Eluationsmenge von 1,5 ml 50%igem wäßrigen Acetonitril löst 75,5 % der aufgetragenen Hirudinmenge ab; zusätzliche 3,5 ml desselben Eluationsmittels eluieren weitere 12,3 % Hirudin.

II. OPTIMIERUNG DER PROBENVORBEREITUNG UND NULLWERTKONTROLLE

OPTIMIERUNG

Die unter C.I (Seite 8 ff) beschriebenen vorbereitenden Versuche mit der C 18-Kartusche zeigten die sehr unterschiedliche Bedeutung der einzelnen Eluationsfraktionen für die Hirudin-Ausbeute.

Mit dem Ziel, das erforderliche Eluationsvolumen möglichst zu reduzieren, wurden weitere Messungen zur fraktionierten Eluierung durchgeführt, diesmal unter RIBA-Kontrolle und mit modifizierter Eluationslösung (40%iges Acetonitril, Verdünnung mit **A**mmonium**h**ydrogen**c**arbonat-Puffer, kurz: **AHC**-Puffer). Es war dies nötig, um das Fassungsvermögen der im RIBA verwendeten Tubes von 1,0 ml nicht zu überschreiten.

Versuchsergebnis:

Wie bei den Vorversuchen (dargestellt in Abb. 5, Seite 10) lieferte Eluat 2 den höchsten prozentualen Anteil, während sich das Verhältnis der Werte von Eluat 1 und 3 umkehrte: Eluat 3 lag prozentual konstant höher als Eluat 1, betragsmäßig jedoch in gleicher Größenordnung wie aus Abb.5 bekannt.

Folgerung für das experimentelle Procedere:

Die **Eluation** aus der SEP-PAK-C 18-Kartusche erfolgt **mit insgesamt 1,5 ml 40%igem Acetonitril** (Verdünnung mit AHC-Puffer), wobei die **erste Eluatsportion von 0,5 ml verworfen** wird und die **restlichen** beiden Eluatsportionen von insgesamt **1,0 ml asserviert** werden.

Bei diesem Vorgehen ist mit einer Verlustrate (bezogen auf die Gesamtbeschickungsmenge der Kartusche an Hirudin) von ca. 35 % zu rechnen. Eine Berechnung zur effektiven Anreicherung des Hirudins in den Proben wird in der Zusammenfassung zur Probenvorbereitung (Seite 15f) angeführt.

NULLWERTKONTROLLE

Bevor nach den Vorversuchen mit der Erstellung von Standard-Eichkurven für die verschiedenen Probenmaterialien begonnen werden konnte (siehe Abschnitt D, Seite 20 ff), mußte sichergestellt werden, daß die jeweilige Probenvorbereitung verläßliche und reproduzierbare Ergebnisse liefert. Zu diesem Zweck wurde die **Messung von Nullwerten** (d.h. es befindet sich kein Hirudin in der Probe) **im RIBA** nach verschiedenen Modalitäten der Probenvorbereitung durchgeführt. Zur Beurteilung der Ergebnisse wurde jeweils eine Standard-Eichkurve im STD-Puffer (wie im Abschnitt B.IV, Seite 6 f beschrieben) herangezogen.

Die Nullwertkontrolle der Probenvorbereitung erfolgte sowohl bei den Urin- wie bei den Gewebsproben unter Veränderung folgender Parameter:

- Pufferzusammensetzung bzw. Vorlage von Protektorsubstanzen
- Menge des zur Aufarbeitung verwendeten Probenmaterials
- Kombination der C 18-Kartusche mit einem weiteren Filtriersystem

II.1. Verwendete Puffer und Protektorsubstanzen bei der Urinproben-Vorbereitung

PUFFER: **STD-Puffer** (= Standard-Puffer)

0,1 m Triäthanolamin
0,2 m Natriumchlorid
0,02 % Natriumazid

pH eingestellt auf 8,3

Verwendung:
- Verdünnung von Probenmaterial
- Aufnahmemittel für Lyophilisate

AHC-Puffer (= Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer)

0,1 m Ammoniumhydrogencarbonat
0,02 % Natriumazid

pH eingestellt auf 7,8

Verwendung:
- Verdünnung von Acetonitril auf 40 %
- Spülung der C 18-Kartusche

PROTEKTORSUBSTANZEN:

Da sich im Urin bekanntermaßen proteolytische und andere enzymatische und mikrobiellle Aktivitäten befinden, wurde versucht, durch Vorlage inhibierender Substanzen in den Urinsammelgefäßen bzw. bei der Aufarbeitung vulnerable Einflüsse auf das Hirudin weitgehend auszuschalten. Selbstverständlich mußten andererseits Einwirkungen auf den RIBA durch die Vorlagen selbst ausgeschlossen werden.

Aprotinin (Trasylol^{R})

Es handelt sich hierbei um einen Serinproteasen-Inhibitor mit breiter Hemmspezifität, dessen Inertheit in Bezug auf den RIBA in einer Nullwert-Reihe im STD-Puffer mit steigenden Aprotininkonzentrationen getestet wurde.
Hierbei zeigte sich keine Veränderung der prozentualen Bindung p bei Konzentrationen von 200, 600, 800, 1000, 1500 und 2000 **KIU** (= Kallikrein-Inhibitor-Units) Aprotinin pro ml STD-Puffer.

Aprotinin (Trasylol^{R})

Infolge Kenntnis der maximal im Urin zu bindenden enzymatischen Aktivitäten ist die Konzentration von **200 KIU/ml als Vorlage im Urinsammelgefäß** ausreichend.
Die Testung der höheren Konzentrationen auf Neutralität bezüglich des RIBA diente dazu, Assay-Verfälschungen für die Fälle auszuschließen, sollte die Urinprobenmenge einmal deutlich im Unterschuß zur vorgelegten Aprotininmenge ausfallen.

Pepstatin

Ergänzend zum Serinproteasen-Inhibitor Aprotinin wurde dieser spezifische Aspartatproteasen-Inhibitor gewählt. Pepstatin hemmt insbesondere Pepsin, das im Urin als Uropepsinogen vorkommt.
Wir strebten hier aus Kostengründen eine Reduzierung der eingesetzten Mengen auf die eben wirksame Konzentration an. Nach Testung der Mengen 120, 60 und 20 µg Pepstatin pro ml Probenansatz (Nullwert-Reihe in Human-Urin), die keine signifikant unterschiedlichen Ergebnisse lieferten, wurde die Konzentration von **20 µg Pepstatin/ml als Vorlage im Urinsammelgefäß** gewählt.

Anmerkung: Bei den Versuchen mit Pavian-Urin wurde die Pepstatin-Konzentration der Vorlage ohne Nachteil verringert auf **1 µg Pepstatin/ml Urinprobe.**

Natriumazid

Natriumazid wurde vorgelegt, um durch seine antimikrobielle Wirkung Keimwachstum während der Lagerung der Urinproben zu verhindern, da eine bakterielle/mikrobielle Besiedelung zum einen das Risiko einer Hirudinzerstörung durch lytische Stoffwechselprodukte mit sich bringt, und zum anderen die Möglichkeit der Störung des RIBA gegeben wäre.
Die Konzentration von **0,02 % (also 0,2 mg NaN_3/ml Urinprobe)** war aus früheren Versuchen als wirksam und den RIBA nicht störend bekannt.

Rinderserum-Albumin (= RSA)

Um zu verhindern, daß sich die zum Teil äußerst geringen Hirudinmengen in den Urinproben (Nanogramm-Bereich) durch unspezifische Adsorption an den Wänden der verwendeten Gefäße dem RIBA-Nachweis entziehen, wurden diese Wandbindungskapazitäten durch Vorlage von RSA in den Sammelgefäßen abgesättigt. Als hierfür geeignet und inert in Bezug auf den RIBA war aus früheren Versuchen eine Konzentration von **2 mg RSA/ml Urinprobe** bekannt.

II.2. Urinproben-Vorbereitung

II.2.a. Proben mit hohem Hirudingehalt

Besitzt die Urinprobe einen **hohen Erwartungswert (0,2 - 1,6 ng Hirudin / 100 µl Probenvolumen)** an Hirudin, so wird auf jegliche vorbereitende Maßnahme verzichtet (weder Kartuschenbeschickung noch Lyophilisation). Es erfolgt die unmittelbare Testung im RIBA in Form des 100 µl-Direkteinsatzes, d.h. es werden 100 µl der Urinprobe entsprechend Abschnitt B.III (1)(a) (Seite 5) in den RIBA eingesetzt.

Vorkommen dieser Probensorte:
- i.v.-Versuche am Pavian
- Versuche zur topischen Anwendung am Schwein
- Versuch zur topischen Anwendung (mit Iontophorese) beim Menschen

II.2.b. Proben mit sehr hohem Hirudingehalt

Besitzt die Urinprobe einen **sehr hohen Erwartungswert (>1,6 ng Hirudin / 100 µl Probenvolumen)** an Hirudin, so läge der RIBA-Meßwert bei unmittelbarer Anwendung des 100 µl-Direkteinsatzes außerhalb des verläßlichen linearen Bereiches der Standard-Eichkurve. Aus diesem Grund wurden in solchen Fällen Verdünnungsreihen der Proben angelegt, die zudem die Möglichkeit von Mehrfachkontrollen boten.

Vorkommen dieser Probensorte:

- i.v.-Versuche am Pavian
- Versuche zur topischen Anwendung am Schwein

Das Fehlen eines Filtrierschrittes im Falle der Proben mit hohem und mit sehr hohem Hirudingehalt zeigte keine störenden Einflüsse auf den RIBA, da aufgrund der geringen Probenmenge auch die potentiellen Störfaktoren in reduzierter Menge vorliegen.

II.2.c. Proben mit niedrigem Hirudingehalt

Bei Urinproben mit **niedrigem Erwartungswert (< 0,2 ng Hirudin / 100 µl Probenvolumen)** an Hirudin ist es nötig, die Hirudinkonzentration im Probenmaterial zu erhöhen, um bei einem Probenvolumen von 100 µl in den Meßbereich des RIBA zu gelangen.
(Eine Erhöhung des Probenvolumens im RIBA ist aus Assay-bedingten Gründen nicht möglich.)

Vorkommen dieser Probensorte:

- Versuche zur topischen Applikation am Menschen

(1) Konzentrierungs- bzw. Filtriermittel

Als Material zur Probenkonzentrierung (Faktorberechnung siehe Seite 15) und gleichzeitigen Filtration gelangte die in den Vorversuchen getestete SEP-PAK-C 18-Kartusche der Firma WATERS zum Einsatz. Zusätzlich wurden Versuchsreihen mit anderen Filtriersystemen durchgeführt, um Möglichkeiten einer weiteren Optimierung der Probenvorbereitung zu untersuchen.

Folgende Variationen wurden erprobt:

- Verzicht auf jegliche vorbereitende Maßnahme
- Alleiniger Einsatz der C 18-Kartusche
- C 18-Kartusche + Filtrierung über PD 10-Säule
- Steril-Filtration über Millipore-Filter + C 18-Kartusche + + PD 10-Säule
- Zentrifugieren bei 20 000 Upm für 45 min + C 18-Kartusche + + PD 10-Säule

Eine Retention des Hirudins selbst durch die Filtriermaßnahmen ist ausgeschlossen, da bei den verwendeten Filtern eine Porengröße von 5 µm vorliegt, Hirudin aber erst durch Poren von 5 nm Durchmesser und darunter zurückgehalten wird (vgl. JOPEN-WOLFF [136]).

Die Eignungsprüfung der Konzentrierungs- bzw. Filtriersysteme geschah durch RIBA-kontrollierte Leerwert-Reihen in Humanurin.

Ergebnisse:

- Der Verzicht auf jegliche Maßnahme führt zu unbrauchbaren Werten.
- Sowohl bei zusätzlicher Steril-Filtration als auch bei zusätzlicher Zentrifugation zeigen die Meßwerte keine signifikante Änderung gegenüber der Vorbereitung ohne diese Maßnahmen.
- Alleiniger Einsatz der C 18-Kartusche als auch die Kombination C 18-Kartusche + PD 10-Säule liefern übereinstimmende Ergebnisse.
  Die RIBA-Bindungsraten liegen hier bei 79,1 - 109,1 %, was bezogen auf die jeweilige Standard-Eichkurve unter Berücksichtigung der dem Test eigenen Varianz stets einem Leerwert entspricht (vgl. Abschnitt B.IV., Seite 7).

(2) Aufgearbeitetes Probenvolumen

Das Beschickungsvolumen für die C 18-Kartusche sollte zum einen möglichst groß sein, um eine hohe Hirudinbeladung der Kartusche zu erzielen; zum anderen zeigte sich aber, daß die Füllmenge aufgrund von Störeffekten bei Überladung der Kartusche limitiert ist.

Es wurden Beschickungsvolumina von 3,0 , 5,0 , 6,0 und 10,0 ml Urinprobe getestet und zwar sowohl in einer Leerwert-Reihe unter RIBA-Kontrolle als auch durch Erstellung probenadaptierter Standard-Eichkurven.

Ergebnis: Ein **Beschickungsvolumen von 3,0 ml Urinprobe** erwies sich als **optimal**; die prozentuale Bindung p betrug dabei 85,5 %, was auf der zugehörigen Standardkurve einem Leerwert entspricht. Ein Kontroll-Leerwert (STD-Puffer; keine vorbereitende Maßnahme) erbrachte eine Bindung von 81,9 %.

Für Urinproben niedrigen Hirudingehaltes (< 0,2 ng Hirudin / 100 µl Probenvolumen) stellt somit die konzentrierende Filtration **ausschließlich an der C 18-Kartusche mit einem Beschickungsvolumen von 3,0 ml Urinprobe die Methode der Wahl** für die Probenvorbereitung dar.

Die Probenaufarbeitung an der C 18-Kartusche gestaltete sich wie folgt:

(1) Äquilibrieren einer neuen oder gebrauchten Kartusche mit 5 ml 100%igem Methanol

(2) Nachspülen mit 5 ml AHC-Puffer

(3) Beladen der Kartusche mit 3,0 ml der Urinprobe

(4) Nachspülen mit 5 ml AHC-Puffer

(5) Eluieren in ein EPPENDORF-RIA-Tube (zur nachfolgenden Lyophilisation und zum Einsatz im RIBA) mit 1,5 ml 40%igem Acetonitril (Verdünnung mit AHC-Puffer), wobei die ersten 500 µl Eluat verworfen und erst die folgenden 1000 µl asserviert werden.

Einschließlich der Lyophilisation des Eluats (mit anschließender Aufnahme des Lyophilisates in 100 µl STD-Puffer) ergibt sich somit für die Hirudinkonzentration im Testansatz ein Anreicherungsfaktor (bezogen auf die ursprüngliche Probe) von 0,65 x 3 x 10 = 19,5.

ZUSAMMENFASSUNG:

Folgendes Procedere kommt für die Urinproben mit niedrigem Erwartungswert an Hirudingehalt zur konzentrierenden und reinigenden Aufarbeitung zur Anwendung:

Anreicherung um den Faktor 1,95

Vorlage von
- 0,3 mg/ml Aprotinin
- 1,0 µg/ml Pepstatin
- 0,2 mg/ml Natriumazid
- 2,0 mg/ml RSA

in den Urinsammelgefäßen (vgl. C.II.1) *

Ziel: Elimination von verfälschenden Einflüssen in der Probe

Beschickung der C 18-Kartusche mit der Probe und Eluierung in beschriebener Art und Weise

Ziel:
- Erhöhung der Hirudinkonzentration im Testansatz
- Reinigung der Probe von störenden Einflüssen (Salze, Pigmente etc.)

Anreicherung um den Faktor 10

Lyophilisation des Eluats über einen Zeitraum von 5 Stunden

Ziel: Weitere Erhöhung der Hirudinkonzentration im Testansatz

* Die Konzentrationsangaben stellen die bei maximaler Füllung des jeweiligen Gefäßes erreichte Minimalkonzentration der vorgelegten Substanz dar; sie steigt ohne störenden Einfluß (siehe C.II.1) bei submaximaler Füllung.

II.3. Gewebsprobenvorbereitung

II.3.a. Verwendete Puffer

Den in einem Gewebshomogenat durch Zellaufschluß in erhöhtem Maße auftretenden proteolytischen Aktivitäten wurde dadurch Rechnung getragen, daß die Homogenisierung der Gewebsproben im Medium des Inhibitor-Puffers (= INH-Puffer) durchgeführt wurde. Dieser besteht aus STD-Puffer, dem die unten genannten proteolyse-inhibierenden Substanzen beigegeben sind. Ihre Konzentrationen basieren auf Erfahrungswerten aus früheren Versuchen (SEEMÜLLER, persönl. Mitteilung, 1983).

INH-Puffer (= Inhibitor-Puffer)

bestehend aus STD-Puffer + 10,0 mmol/l EDTA (entspr. 3,72 g/l)
+ 5,1 µmol/l Aprotinin (entspr. 33,2 mg/l)
+ 1,5 µmol/l Pepstatin (entspr. 1,0 mg/l)
+ 1,0 µmol/l SBTI (entspr. 21,0 mg/l)
+ 2,8 µmol/l E 64 (entspr. 1,0 mg/l)

pH eingestellt auf 8,3

Verwendung: Bei allen Schritten der Gewebsproben-Vorbereitung bis zum Einsatz der C 18-Kartusche

AHC-Puffer (wie auf Seite 12 beschrieben)

Verwendung: Bei allen Schritten der Gewebsproben-Vorbereitung ab Einsatz der C 18-Kartusche

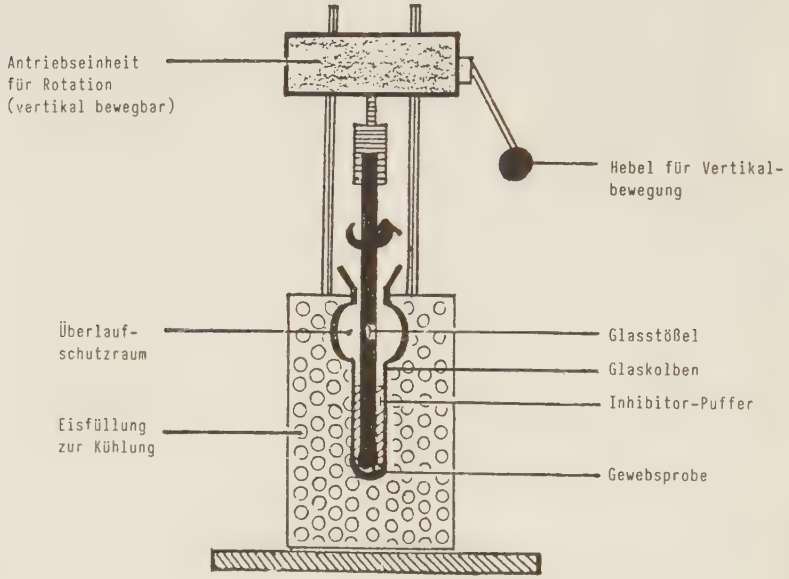
II.3.b. Durchführung

Die Ausführungen beziehen sich auf Human- und Schweinegewebsproben, die sich hinsichtlich ihrer Aufarbeitung und ihrem Eichkurvenverlauf nicht wesentlich unterscheiden, sodaß humane Hautgewebsproben zum Teil auch über Standard-Eichkurven aus Schweinegewebe (wegen der einfacheren Gewebsgewinnung) ausgewertet wurden. Die Erstellung **einer** Standardkurve erfolgte aber stets mit Gewebe von ausschließlich **einer** Spezies.

Die primäre Gewebsproben-Aufarbeitung bestand im mechanischen Gewebsaufschluß durch ein elektrisch betriebenes Homogenisierungsgerät. Durch Rotation (1500 Upm) und gleichzeitige Vertikalbewegung (ca. 20 Hübe pro min) des Glasstößels im Glaskolben unter Zugabe von insgesamt 2500 µl INH-Puffer für eine Dauer von 3-6 min pro Gewebsprobe (je nach Konsistenz) wurden die Gewebspartikel homogenisiert.
Die Reinigung des Homogenisatorgefäßes samt Stößel zwischen den einzelnen Probenaufarbeitungen erfolgte durch Spülung mit Aqua dest. und 96%igem Alkohol mit anschließender Trocknung.

Im Zeitintervall von der Probengewinnung bis zur Homogenisierung wurden die Gewebspartikel zum Schutz vor Autolyse und Hirudin-Aktivitätsminderung bei -75°C tiefgefroren gelagert. (Vgl. hierzu Abschnitt F, Seite 28 ff)

Abb. 6: Gewebshomogenisierung mittels Potter der Firma BRAUN



Die makroskopische Reinigung des Homogenats bestand in der Zentrifugation bei 12 000 Upm für die Dauer von 5 Minuten; der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und das bodenständige Zentrifugat verworfen.

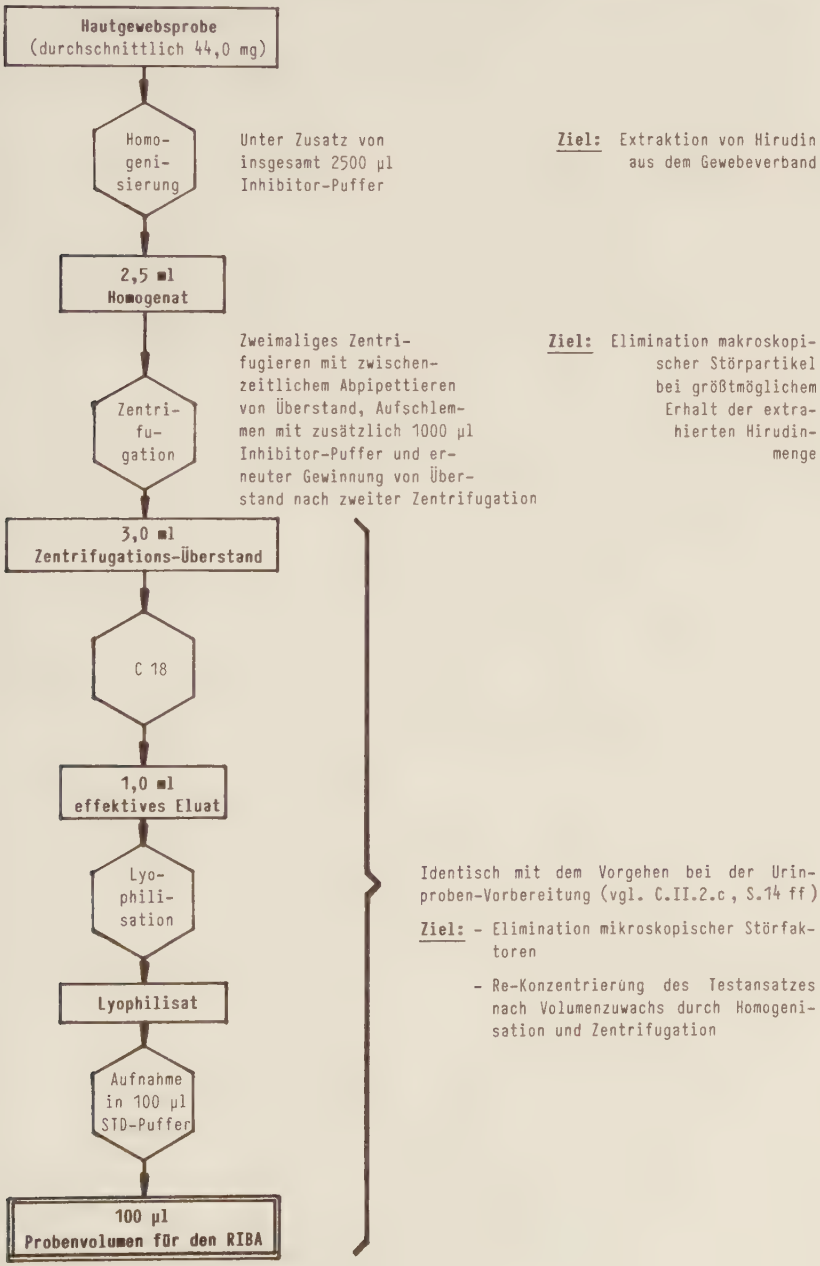
Die mikroskopische Reinigung geschah durch Aufbringen des abpipettierten Überstandes der Zentrifugation auf eine C 18-Kartusche und anschließende Eluation wie bei den Urinproben niedrigen Hirudingehaltes (vgl. Seite 14 ff).

Die darauffolgende Lyophilisation und Aufnahme des Lyophilisates in je 100 µl STD-Puffer führte schließlich zum gleichen Probenvolumen für die RIBA-Messung wie bei den Urinproben.

Entsprechend der Konsistenz des Probenausgangsmaterials (Gewebe) erfolgt der Bezug der ermittelten Hirudinmenge auf die Feuchtmasse der Probe in Milligramm, gemessen sofort nach Materialgewinnung.

ZUSAMMENFASSUNG:

Folgende vorbereitenden Maßnahmen kommen für Hautgewebsproben (Humangewebe wie auch Schweinegewebe) vor der Testung im RIBA zum Einsatz:



D. PROBENADAPTIERTE STANDARD-EICHKURVEN

Da die verwendeten Probenmaterialien Urin und Gewebe vor ihrer Testung im RIBA unterschiedlichen und zum Teil umfangreichen Vorbereitungsmaßnahmen unterzogen wurden, wäre die Auswertung der Meßwerte über Standard-Eichkurven im STD-Puffer, bei denen das Hirudin diesen Maßnahmen nicht ausgesetzt ist, nicht adäquat gewesen. Es war daher nötig, **probenadaptierte Standard-Eichkurven** zu erstellen.
Die Anpassung der Standardkurven an die jeweilige Probensorte geschah wie folgt:

I. URIN-STANDARDKURVEN

Typ I: **Hoher Hirudingehalt des Urins** (0,2 - 1,6 ng Hirudin / 100 µl Urin)

Die Standardkurven zu diesen Proben wurden entsprechend der Beschreibung in Abschnitt B.IV (Seite 6) erstellt, wobei zur optimalen Anpassung an das Probenmaterial die Verdünnungsreihe des Hirudin-Standards nicht mit STD-Puffer, sondern mit Leer-Urin (= hirudinfreier Urin) der Spezies der jeweiligen Versuchsreihe angesetzt wurde.

Sehr hoher Hirudingehalt des Urins (> 1,6 ng Hirudin / 100 µl Urin)

In diesen Fällen, die sich von den vorigen nur dadurch unterscheiden, daß die Proben vor dem Einsatz im RIBA eine Verdünnung erfuhren (vgl. Abschnitt C.II.2.b, Seite 14), wurde in gleicher Weise verfahren wie oben beschrieben.

Abb. 7 (Seite 21) zeigt ein Beispiel für eine Urin-Standardkurve vom Typ I.

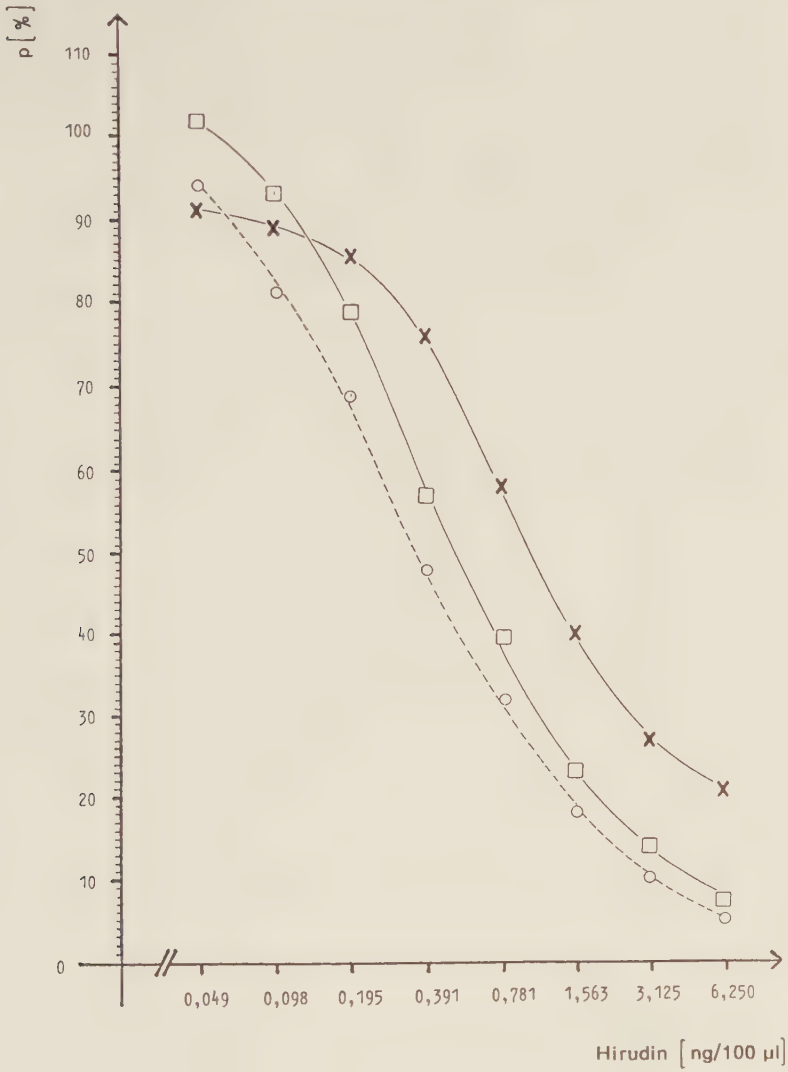
Typ II: **Niedriger Hirudingehalt des Urins** (< 0,2 ng Hirudin / 100 µl Urin)

Analog zur Aufarbeitung der Proben dieser Sorte (vgl. Abschnitt C.II.2.c, Seite 14) wurde zur Erstellung der zugehörigen Standardkurven Leer-Urin gleicher Menge wie bei den zur Testung eingesetzten Proben (3 ml) mit Hirudin-Standard der in Abschnitt B.IV (Seite 6) beschriebenen Verdünnungsstufen (3) bis (10) versetzt und durchlief die gleichen Vorbereitungsprozeduren wie die eigentlichen Proben unbekannten Hirudingehaltes.

Die so gewonnenen Standardkurven vom Typ II unterscheiden sich zum Teil sowohl deutlich von der Standardkurve im STD-Puffer, von der Standardkurve Typ I als auch untereinander, d.h. die mehrfache Erstellung von Standardkurven Typ II liefert variierende Kurvenverläufe.

Abb. 7 (Seite 21) zeigt ein Beispiel für eine Urin-Standardkurve vom Typ II.

Abb. 7: Beispiele für Urin-Standardkurven Typ I und Typ II
(vgl. Abb. 3, Seite 7)



X——X——X Standardkurve Typ II
(Human-Urin; Kurve vom 21.07.83)

□——□——□ Standardkurve Typ I
(Pavian-Urin; Kurve vom 28.09.83)

○- - -○- - -○ Standardkurve im STD-Puffer
(Kurve vom 28.11.83)

II. HAUTGEWEBE-STANDARDKURVEN

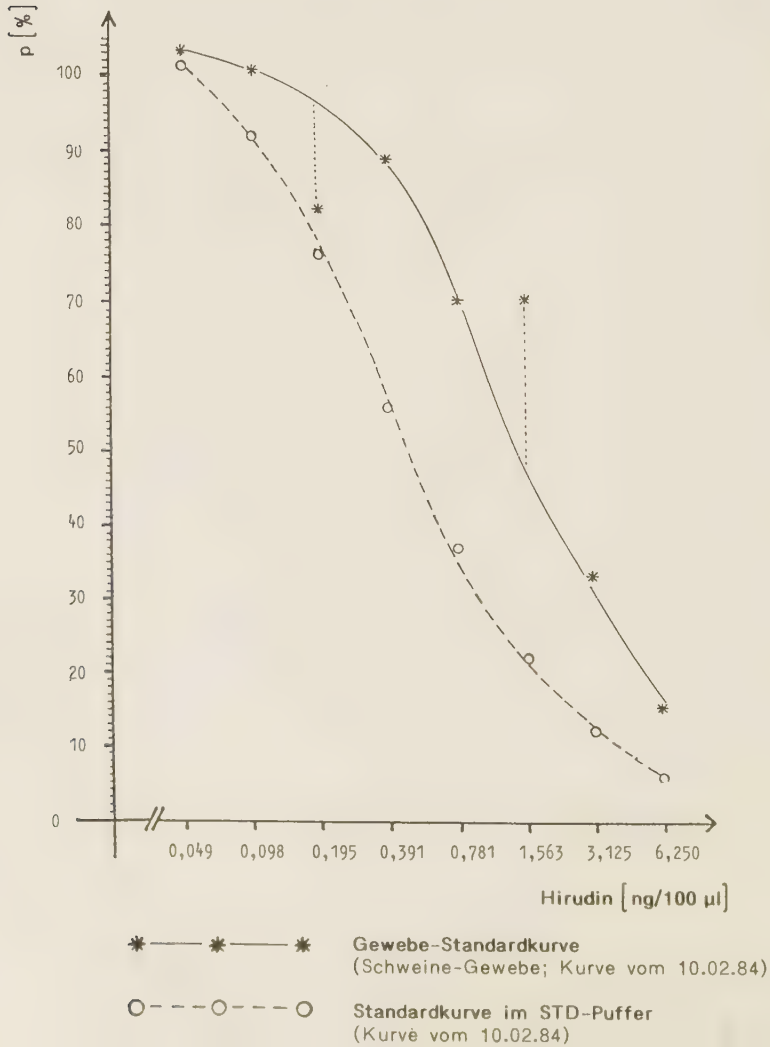
Die Adaptation der Standardkurven an die Probensituation geschah bei den Schweine- und Humangewebsproben auf folgende Weise:

Hirudinfreies Gewebe gleicher durchschnittlicher Menge wie die zur Testung eingesetzten Proben (Probengewicht im Durchschnitt 44 mg; siehe Dritter Teil, Abschnitt E) wurde mit Hirudin-Standard der Verdünnungsstufen ③ bis ⑩ (vgl. Seite 6) versetzt und durchlief die gleichen Vorbereitungsmaßnahmen (vgl. Abschnitt C.II.2.c, Seite 14 ff) wie die eigentlichen Proben unbekannten Hirudingehaltes.

Für die Erstellung **einer** Standardkurve wurde ausschließlich Gewebe **einer** Spezies verwendet (nur Schweine- bzw. nur Humangewebe).

Abb. 8: Beispiel für eine Gewebe-Standardkurve

(vgl. Abb. 3, Seite 7)



E. FEHLERBETRACHTUNG UND NACHWEISGRENZEN DES RIBA

I. FEHLERBETRACHTUNG

I.1. Variationskoeffizienten

I.1.a. Inter-Assay-Variationskoeffizient

Es ist darunter die prozentuale Abweichung der Meßwerte vom wahren Wert zu verstehen, wendet man einen Test mehrfach zu verschiedenen Zeiten auf eine definierte , stets identische Probe (= Aliquote eines Teststandards) an.

Für den RIBA wird dieser Wert von DODT [134] mit maximal 11 % bei 6 Testansätzen angegeben.

I.1.b. Intra-Assay-Variationskoeffizient

Dieser Koeffizient nennt die prozentuale Abweichung der Meßwerte eines Testes vom wahren Wert bei gleichzeitiger Messung mehrerer identischer Proben (= Aliquote eines Teststandards) im gleichen Testansatz.

Für den RIBA beziffert DODT [134] diesen Wert auf maximal 6 % bei Dreifachbestimmungen.

I.2. Graphische Auswertung der Assay-Varianzen

Die oben genannten Prozentwerte beziehen sich auf Messungen in Lösungen, die keiner Probenvorbereitung unterzogen werden mußten.

Für Versuchsansätze mit umfangreicher Probenvorbereitung müssen diese Werte zum Teil höher angesetzt werden und unterliegen hier auch deutlichen Schwankungen. Insbesondere zeigen sich quantitative Unterschiede zwischen Urinproben- und Gewebsproben-Messungen und auch innerhalb der Probengruppen, vor allem bei unterschiedlichem Vorbereitungsmodus. Auf eine Koeffizientenberechnung wurde deshalb verzichtet zugunsten der exemplarischen graphischen Darstellung.

I.2.a. Inter-Assay-Varianz

Abb. 9 und Abb. 10 (Seite 24) demonstrieren anhand von Standard-Eichkurven exemplarisch die Meßwert-Varianz bei verschiedenen Testansätzen.

I.2.b. Intra-Assay-Varianz

Abb. 11 und Abb. 12 (Seite 25) zeigen - wiederum exemplarisch anhand von Standard-Eichkurven - die Varianz von Dreifachbestimmungen innerhalb eines Testansatzes.

Abb. 9: Varianz der Kurvenverläufe in verschiedenen RIBA-Testansätzen bei Urinstandardkurven

(Inter-Assay-Varianz)

(vgl. Abb. 3, Seite 7)

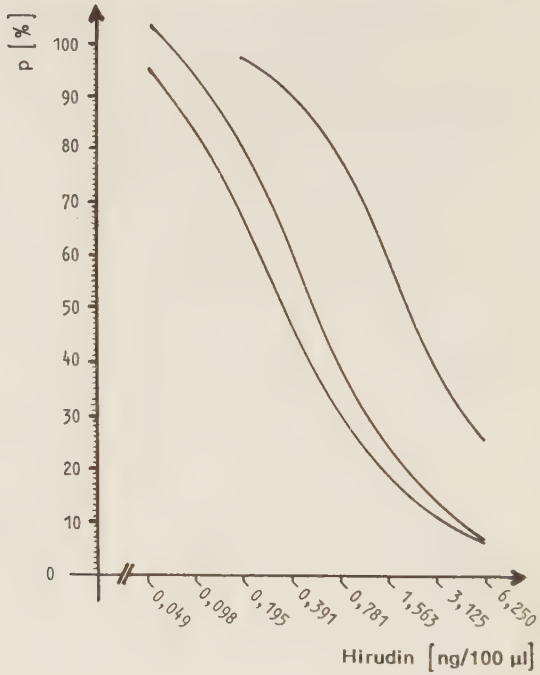


Abb. 10: Varianz der Kurvenverläufe in verschiedenen RIBA-Testansätzen bei Gewebsstandardkurven

(Inter-Assay-Varianz)

(vgl. Abb. 3, Seite 7)

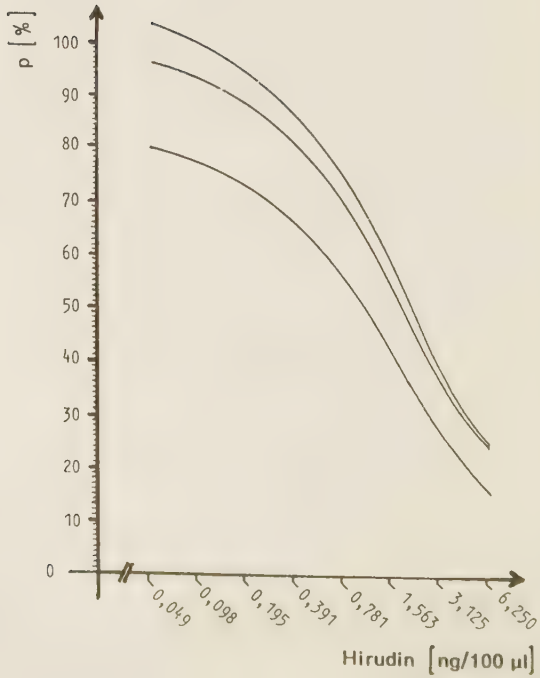


Abb. 11: Varianz der Einzelmessungen bei Dreifachbestimmungen im selben RIBA-Testansatz bei einer Urinstandardkurve

(Intra-Assay-Varianz)

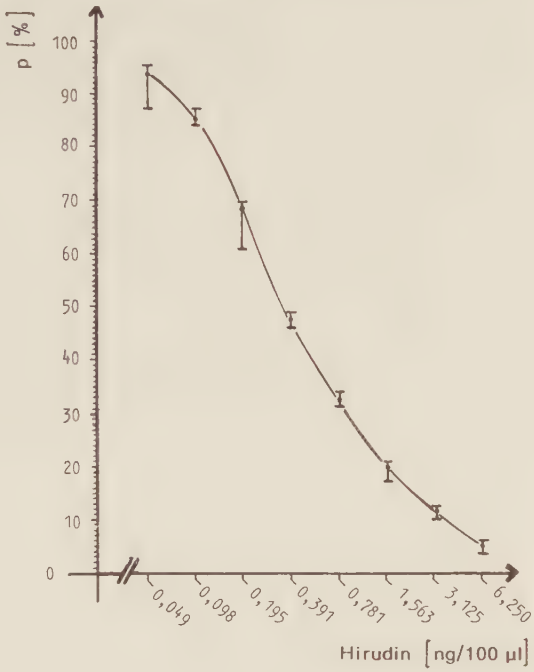
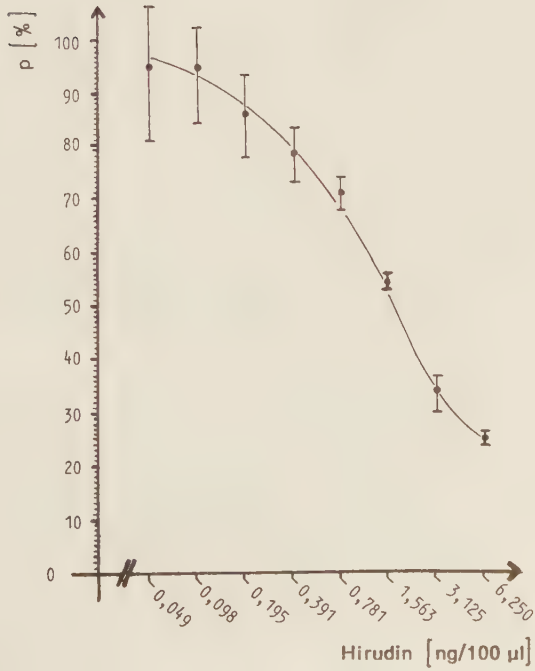


Abb. 12: Varianz der Einzelmessungen bei Dreifachbestimmungen im selben RIBA-Testansatz bei einer Gewebsstandardkurve

(Intra-Assay-Varianz)



I.3. Störfaktoren der Nachweismethodik

Abgesehen von der statistischen Schwankungsbreite der Ergebnisse konnten erhöhte Meßwert-Varianzen in Abhängigkeit von bestimmten Probenkriterien beobachtet werden.

I.3.a. Urinproben

Hier zählen zu den Störgrößen:

- Hohes spez. Gewicht (durch hohen Gehalt an Salzen, Pigmenten etc.)
- Proteinurie
- Zu lange Lagerungsdauer (siehe hierzu Abschnitt F, Seite 28 ff)

I.3.b. Gewebsproben

Störende Auswirkungen zeigten:

- Mangelhafte Homogenisierbarkeit bei erhöhtem Gehalt an bindegewebigen Strukturen
- Hoher Lipidgehalt

II. NACHWEISGRENZEN DES RIBA

II.1 Verdünnungsfaktor - Anreicherungsfaktor

II.1.a. Urinproben

Bei Proben **hohen Hirudingehaltes** (0,2 - 1,6 ng/100 µl) liegt aufgrund des 100µl-Direkteinsatzes der Faktor 1 vor.

In den Fällen eines **sehr hohen Hirudingehaltes** (> 1,6 ng/100 µl) ist bei der Auswertung der RIBA-Meßwerte wegen der vorhergehenden Probenverdünnung der entsprechende Verdünnungsfaktor (1:2, 1:4, 1:8 usw.) zu berücksichtigen.

Bei **niedrigem Hirudingehalt** (< 0,2 ng/100 µl) ist durch die Probenvorbereitung ein Anreicherungsfaktor von 19,5 gegeben.

II.1.b. Hautgewebsproben

Nach der Zusammenfassung in Abschnitt C.II.4, Seite 19, setzt sich die Gewebsproben-Vorbereitung aus zwei Teilen zusammen; der erste stellt den gewebsspezifischen Teil dar, der zweite ist identisch mit dem Modus der Vorbereitung von Urinproben niedrigen Hirudingehaltes.

So läßt sich für den zweiten Teil ein Anreicherungsfaktor von 19,5 entsprechend oben angeben; die Hirudinverluste im ersten Teil der Gewebsproben-Vorbereitung sind jedoch unbekannt, sodaß auch keine Aussage über den effektiven Gesamtfaktor möglich ist.

II.2. Bedeutung der Standard-Eichkurven

Die Verwendung von Standard-Eichkurven bietet den Vorteil, daß für die Meßwert-Auswertung die Kenntnis des Anreicherungsfaktors der Probenvorbereitung nicht nötig ist, da dieser Faktor durch die Probenadaptation (d.h. jede Eichprobe durchläuft diesselben Maßnahmen wie eine zu testende Probe unbekannten Hirudingehaltes) der Standardkurven bereits berücksichtigt ist.

II.3. Probenspezifische Nachweisgrenzen

Ein Überschreiten der **oberen Nachweisgrenze von 6,250 ng Hirudin/100 µl Probenvolumen** konnte durch entsprechende Probenverdünnung vermieden werden.

Für die Bestimmung der **unteren Nachweisgrenzen** sind zwei Kriterien maßgeblich:

1. Verläßlich bestimmbarer minimaler Wert auf der jeweiligen Standard-Eichkurve

   Wie aus den Abb. 11 und 12 (Seite 25) ersichtlich ist, zeigt der Meßbereich der niedrigen Hirudinwerte größere Varianzen als der Bereich der hohen Werte. Außerdem vermindert sich aufgrund des flacheren Verlaufes der sigmoiden Standardkurve und der höheren Varianzen im Bereich der niedrigen Hirudinwerte die Genauigkeit der graphischen Auswertbarkeit.
   Aus diesen Gründen wurde bei jeder Standardkurve für die Auswertung eine Verläßlichkeitsgrenze am linksseitigen Übergang vom linearen zum sigmoiden Kurvenanteil gezogen. In der Regel findet sich diese Grenze bei 0,2 ng Hirudin/100 µl Probenvolumen.

2. Repräsentierte Probenmenge (100 µl bzw. 3,0 ml) im 100 µl-Probenvolumen des RIBA

   Beim 100 µl-Direkteinsatz liegt die Nachweisgrenze bei 0,2 ng Hirudin / 100 µl Urin (siehe oben) entsprechend **2,0 ng Hirudin / ml Urin.**

   Bei den Urinproben niedrigen Hirudingehaltes wird durch Beibehaltung der Eichwerte der Standardkurve bei gleichzeitiger Erhöhung der Probenausgangsmenge auf das 30-fache (also 3,0 ml Urin) mit anschließender Einengung auf das standardisierte Probenvolumen von 100 µl die Nachweisgrenze auf 1/30 der zuvor genannten Grenze abgesenkt.
   Sie beträgt somit 2,0 ng Hirudin / 100 µl Probenvolumen (≙ 3,0 ml aufgearbeitete Urinprobe) entsprechend **~ 0,07 ng Hirudin / ml Urin.**

   Die durch die Probenaufarbeitung entstehenden Verluste an effektiv vorhandenem Hirudin (ca. 35 % Verlustrate bei C 18-Kartuschen-Schritt; siehe Seite 11 und 15) bedingen die Parallelverschiebung der probenadaptierten Standard-Eichkurven vom Typ II in positiver Richtung der Abszisse im Vergleich zu den Standardkurven im STD-Puffer und zu denen des Typs I (siehe Abb. 7, Seite 21).

II.3.a. Urinproben

Minimal erfaßt werden ~ 0,2 ng Hirudin / 100 µl Probenvolumen (3,0 ml Urinprobe repräsentierend), das bedeutet eine

Nachweisgrenze von ~ 70 pg Hirudin / ml Urin.

II.3.b. Hautgewebsproben

Bei einer minimalen Erfassung von ~ 0,2 ng Hirudin / 100 µl Probenvolumen (im Durchschnitt 44 mg Gewebe repräsentierend) ergibt sich hier eine

Nachweisgrenze von ~ 5 pg Hirudin / mg Gewebe.

F. STABILITÄTSNACHWEIS FÜR HIRUDIN

I. DATEN DER LITERATUR ZUR HIRUDIN-STABILITÄT

Zur Haltbarkeit des Hirudins unter verschiedenen Bedingungen wurden bereits vielfältige Untersuchungen durchgeführt; eine Zusammenfassung der Ergebnisse, insbesondere von MARKWARDT [113], findet sich bei JOPEN-WOLFF [136]; die wichtigsten Feststellungen sind nachstehend wiedergegeben:

Die Stabilität von Hirudin beträgt

in trockenem Zustand: mehrere Jahre;
in wäßriger Lösung: 6 Monate bei Ausschaltung mikrobieller Zersetzung;
bei Hitzeeinwirkung von 80°C: 15 Minuten; innerhalb dieser Zeit ist kein Aktivitätsverlust nachweisbar. Die Hitzebeständigkeit nimmt mit zunehmend alkalischem Milieu ab.

Bei Einwirkung denaturierender Stoffe wie **50%igem Äthanol, 8 M Harnstoff** oder **alkalischen Lösungen vom pH 12** ist k e i n Aktivitätsverlust nachweisbar.

II. STABILITÄT VON HIRUDIN IN LYOPHILISATEN UND IN URIN

Um zu vermeiden, daß ungeeignete Methoden der Probenlagerung zu einer erheblichen Verminderung bzw. einer Unmeßbarkeit potentiell vorhandenen Hirudins führen, wurden Kontrollmessungen von Aliquoten eines Hirudin-Standards bei unterschiedlichen Lagerungsmodalitäten durchgeführt.
Die Reduktion probenbedingter Aktivitätsverluste wurde durch die in Abschnitt C.II.1 (Seite 12 f) beschriebene Vorlage von Protektorsubstanzen sichergestellt.

II.1. Während der Lagerung als Lyophilisat

Ausgehend von der in der Literatur beschriebenen Stabilität von Hirudin als Trockensubstanz über mehrere Jahre (siehe oben) sollte die Lagerung von Urinproben als Lyophilisat nach der Aufarbeitung als unbedenklich betrachtet werden können.
Trotzdem sollte in einer Testreihe untersucht werden, ob für das am häufigsten vorkommende Lagerungsintervall von wenigen Tagen bis zu einer Woche Hirudin-Aktivitätsverluste in den Lyophilisaten nachzuweisen sind.

Versuchsansatz:

An fünf aufeinanderfolgenden Tagen wird je eine frisch gewonnene Human-Urinprobe mit einem Aliquot eines Hirudin-Standards * versetzt. Die so angesetzte Probe wird sodann der Probenvorbereitung nach Abschnitt C.II.2.c (Seite 14 ff) unterzogen und als Lyophilisat bei -20°C eingefroren. Am siebten Tag nach Beginn der Versuchsreihe wird eine Probe in gleicher Weise angesetzt, das Lyophilisat aber nicht eingefroren, sondern unmittelbar zusammen mit den fünf anderen (wieder aufgetauten) Lyophilisaten im RIBA getestet.

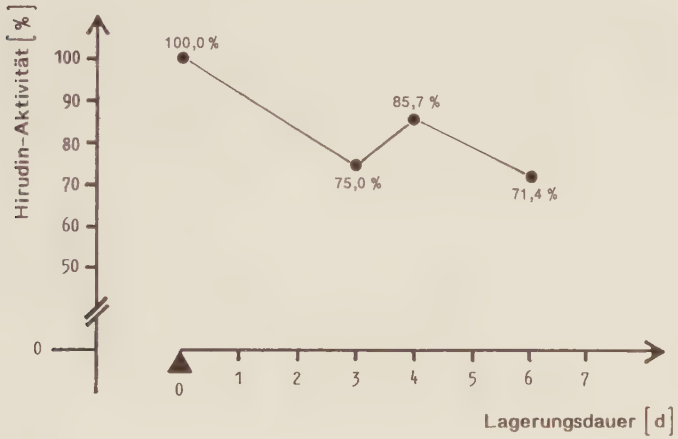
---

* Als eingefrorene antimikrobielle wäßrige Lösung (STD-Puffer; siehe Zusammensetzung Seite 12) sind die Aliquote des verwendeten Hirudin-Standards, die bis zum Einsatz am jeweiligen Versuchstag bei -20°C gelagert wurden, gemäß den Angaben der Literatur als stabil innerhalb des Versuchszeitraumes zu betrachten.

Versuchsauswertung:

Der am 7. Tag gewonnene Meßwert (= Lagerungsdauer 0 Tage) wird als 100 % gesetzt und die Meßwerte der vorhergehenden Tage werden darauf bezogen. Abb. 13 zeigt die ermittelten Aktivitäten.

Abb. 13: Hirudin-Aktivitätsabfall bei Lagerung als Lyophilisat bei -20°C
(Gewonnen aus Human-Urinproben)



Anmerkungen:
- Für die Lagerungstage 1 und 2 wurden keine Proben angesetzt.
- Die für die Lagerungstage 5 und 7 angesetzten Proben lieferten keine im Gültigkeitsbereich der Standardkurve auswertbaren Meßergebnisse.

Ergebnis:

Bei Lagerung der Lyophilisate bis zu einer Woche bei -20°C zeigt sich ein Hirudin-Aktivitätsabfall um im Mittel 23 % des Ausgangswertes.
Man hat somit in der ersten Lagerungswoche mit einer auf etwa 77 % der Ausgangsaktivität geminderten Hirudin-Aktivität zu rechnen.

Diskussion:

Die graphische Auswertung legt einen initial raschen und dann nur noch langsam fortschreitenden Aktivitätsabfall nahe; die geringe Zahl der Meßwerte läßt jedoch aufgrund der statistischen Streubreite hierüber keinen zwingenden Schluß zu (vgl. Diskussion Seite 31).

II.2. In Human-Urin während der Lagerung bei -20°C

Entsprechend den Modalitäten der Versuche zum Hirudin-Nachweis im Human-Urin nach topischer Applikation (vgl. Dritter Teil, Abschnitt D, Seite 92 ff),bei denen im Durchschnitt über eine Woche Urin gesammelt und bis zur gemeinsamen Aufarbeitung und RIBA-Testung am Ende der Sammelperiode bei -20°C gelagert wurde, sollte eine Versuchsreihe erstellt werden, die Aufschluß über das Aktivitätsverhalten von Hirudin unter diesen Bedingungen gibt.

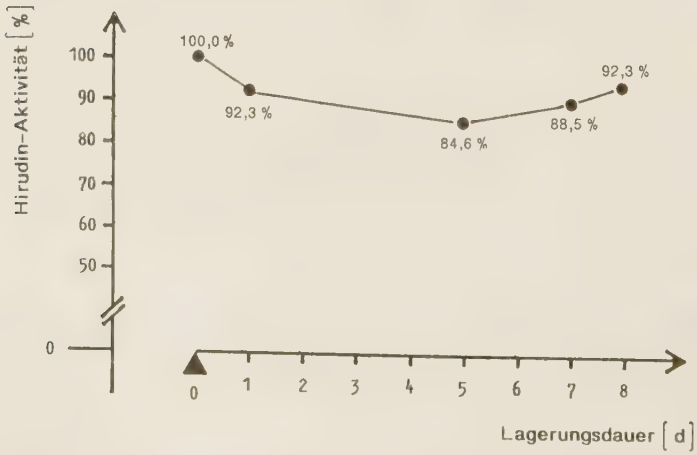
Versuchsansatz:

An sechs von acht aufeinanderfolgenden Tagen wird je eine frisch gewonnene Human-Urinprobe mit einem Aliquot eines Hirudin-Standards (vgl. Seite 29) versetzt. Die so angesetzten Proben werden dann bei -20°C eingefroren und bis zum 8. Tag gelagert; am 8. Tag werden alle sechs Lagerungs-Proben aufgetaut und zusammen mit einer siebten, frisch angesetzten Probe der Aufarbeitung nach Abschnitt C.II.2.c (Seite 14 ff) unterzogen und im RIBA getestet.

Versuchsauswertung:

Der am 8. Tag gewonnene Meßwert (= Lagerungsdauer 0 Tage) wird als 100 % gesetzt und die Meßwerte der vorhergehenden Tage werden darauf bezogen. Abb. 14 zeigt die gemessenen Aktivitäten.

Abb. 14: **Hirudin-Aktivitätsabfall in Human-Urinproben bei Lagerung als Gefriergut bei -20°C**



Anmerkungen:
- Für die Lagerungstage 2 und 3 wurden keine Proben angesetzt.
- Lagerungstag 4 erbrachte kein im Gültigkeitsbereich der Standardkurve liegendes Ergebnis.
- Lagerungstag 6 lieferte einen falsch-positiv überhöhten Wert, der außerhalb der statistischen Streubreite liegt; er wurde deshalb für die Auswertung außer acht gelassen.

Ergebnis:

Die Lagerung von Human-Urinproben bei -20°C über einen Zeitraum von acht Tagen ergab eine Minderung der nachweisbaren Hirudin-Aktivität um 7,7 - 15,4 % des Ausgangswertes.

Diskussion:

Die graphische Auswertung läßt im vorgegebenen Lagerungsintervall keine Tendenz im Abfall der Hirudin-Aktivität in Abhängigkeit von der Zeit erkennen. Der mittlere Abfall der Hirudin-Hemmaktivität liegt über den gesamten Zeitraum bei 11 % des Ausgangswertes.

Diese Beobachtung sowie die Resultate beim Lyophilisat lassen den Schluß zu, daß der Verlust der Inhibitoraktivität bereits beim Einfrieren zustande kommt; ein denaturierender Effekt beim relativ langsamen Einfrieren von Proteinen (bei -20°C) ist bekannt.
Auch der etwas höhere Aktivitätsverlust im Lyophilisat gegenüber den Urinproben wäre dadurch erklärbar: "Schutzproteine" im Urin vermindern unter Umständen den Aktivitätsverlust beim Einfrieren.

II.3. Bei Erwärmung

Die von MARKWARDT [113] untersuchte Hitzestabilität von Hirudin (siehe Seite 28) sollte durch eigene Versuche bestätigt werden, da im Rahmen der Gewebsvorbereitung nach Abschnitt C.II.3. (Seite 17 ff) mittels des Potters der Firma BRAUN trotz Eiskühlung zumindest kurzfristig deutliche Erwärmungen aufgrund der Scherkräfte auftreten.
Zugunsten einer quantitativen Auswertbarkeit wurde die thermische Stabilität von Hirudin in hirudinhaltigem Urin (vom Pavian) und nicht in Extrakten von Gewebsproben geprüft, da Messungen im Urin geringere Varianzen zeigen (siehe Abb. 12, Seite 25).

II.3.a. auf +60°C für 60 min

Die Untersuchungen mit unterschiedlichen Hirudinkonzentrationen zeigten nach Erwärmen Abweichungen vom Ausgangswert von +5,6 bzw. -3,1 bzw. -6,7 %. Diese Werte liegen innerhalb der Schwankungsbreite der Nachweismethode und zeigen keine Tendenz, sodaß von einer **100%igen Stabilität bei genannter thermischer Belastung** auszugehen ist.
Der pH-Wert der untersuchten Urinlösungen lag zwischen 7,0 und 8,5.

II.3.b. auf +80°C für 15 min

Auch hier ergaben sich für unterschiedliche Hirudinkonzentrationen im statistischen Varianzbereich liegende Abweichungen vom Ausgangswert um ± 0 bzw. +12,5 bzw. -3,3 %, sodaß ebenfalls von einer **100%igen Stabilität bei genannter thermischer Belastung** ausgegangen werden kann.
Auch hier bewegte sich der pH-Wert der untersuchten Urinlösungen zwischen 7,0 und 8,5.

III. HIRUDIN-STABILITÄT IN EXTRAKTEN VON HAUTGEWEBSPROBEN

Aufgrund der deutlichen Varianzen bei der Messung des Hirudingehaltes von Gewebsproben (siehe Abb. 12, Seite 25) wären für diese Probensorte vergleichende Messungen unter verschiedenen Bedingungen der Probenlagerung kaum signifikant.

Darüberhinaus erfolgte die Bewertung der Meßwerte der Gewebsproben letztendlich semi-quantitativ (vgl. DRITTER TEIL, Abschnitt E, Seite 110/ 111, 116 und 121 f), sodaß sich die Quantifizierung eines potentiellen Aktivitätsabfalles in den Proben ohnehin erübrigt.

Ferner wurden folgende Maßnahmen ergriffen, um einen Aktivitätsabfall a priori auf ein Minimum zu beschränken:

- Verhütung von Autolyse durch Schockgefrieren der Proben in flüssigem Stickstoff sofort nach Entnahme und anschließende Lagerung bei -75°C bis zur Aufarbeitung
- Beschränkung der Lagerungszeit der Gewebsproben auf einige Tage bis wenige Wochen durch frühzeitige Aufarbeitung bis zum Lyophilisat
- Reduzierung der Noxen bei der Aufarbeitung der Proben durch die in Abschnitt C.II.3 (Seite 17) beschriebenen Puffer
- Beschränkung der Lyophilisat-Lagerungsdauer durch frühestmögliche RIBA-Testung

Der Nachweis der thermischen Belastbarkeit des Hirudins (bei der Gewebshomogenisierung) wurde in Abschnitt F.II.3 (Seite 31) geführt.

*

MORPHOLOGISCHE UND FUNKTIONELLE ASPEKTE DER PERKUTANEN PHARMAKON-AUFNAHME

VORBEMERKUNG 33

A. MORPHOLOGIE UND FUNKTION DER MENSCHLICHEN HAUT . . 33
I. ANATOMIE DER HAUT 33
II. FUNKTIONEN DER HAUT 35
1. Physiologische Funktionen 35
2. Pharmakodynamische Funktionen 35
a. Barriere-Funktion 36
b. Kompartiment-Funktion 36
c. Metabolische Funktion 37

B. WEGE DER PERKUTANEN PHARMAKON-AUFNAHME . . . 38
I. PHARMAKON-AUFNAHME VIA HAUTANHANGSGEBILDE . . 38
1. Transfollikulärer Weg 38
2. Transglandulärer Weg 38
II. TRANSEPIDERMALE AUFNAHME 38
III. QUANTITATIVE WERTUNG DER PERKUTANEN AUFNAHMEWEGE 39

C. TERMINOLOGIE DER PERKUTANEN PHARMAKON-AUFNAHME . 40
I. DEFINITION DER PERKUTANEN ABSORPTION . . . 40
1. Penetration 40
2. Permeation 40
3. Resorption 40
II. QUANTIFIZIERUNG DER PERKUTANEN DURCHLÄSSIGKEIT . 41
1. Kumulative epidermale Durchtrittsgrößen 42
a. Haut-Permeation (HP) 42
b. Renale Elimination nach Permeation (EP) . . . 42
c. Standard-Haut-Permeation (SHP) 43
d. Renale Standard-Elimination nach Permeation (SEP) . . 43
2. Intervallbezogene epidermale Durchtrittsraten . . . 44
a. Haut-Permeations-Rate (HPR) 44
b. Renale Eliminations-Rate nach Permeation (ERP) . . 44
c. Standard-Haut-Permeations-Rate (SHPR) 45
d. Renale Standard-Eliminations-Rate nach Permeation (SERP) . 45
3. Ergänzende Ausblicke 46

D. FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DES PERKUTANEN STOFFDURCHTRITTS 47

I. TRANSPORTMECHANISMEN ÜBER BIOLOGISCHE GRENZSTRUKTUREN . . 47

1. Interzelluläre Transportmechanismen 47

2. Intrazelluläre Transportmechanismen 47

II. MECHANISMEN BEI PERKUTANEN TRANSPORTPROZESSEN . 47

1. Morphologische Grundlagen der transmembranösen Lipiddiffusion 48

2. Quantifizierende Beschreibung des Diffusions-Vorganges . . 49

3. Inverse Penetration 49

E. VARIATIONSPARAMETER INTEGUMENTALER DURCHLÄSSIGKEIT . 50

I. PHYSIKALISCHE VARIATIONSPARAMETER 50

1. Mechanische Einflüsse 50

a. Druck und Zug 50
b. Enthaarung 50
c. Klebestreifen-Stripping 50

2. Ultraschall-Einwirkung (Phonophorese) 51

3. Thermische Einflüsse 51

4. Einflüsse durch elektrischen Strom 52

5. Einfluß der Hautdurchfeuchtung (Hydratation) . . . 53

II. CHEMISCHE VARIATIONSPARAMETER 54

1. pH-Wert - Bedeutung und Beeinflußbarkeit 54

2. Bedeutung oberflächenaktiver Substanzen 54

3. Toxische Einflüsse 55

a. Schadstoffe 55
b. Medikamente 55
c. Desinfektionsmittel, Hautpflegemittel und Kosmetika . . 55

III. INDIVIDUELLE VARIATIONSPARAMETER 56

1. Biologische Einflußgrößen 56

2. Pathologische Determinanten 56

IV. PHARMAKOLOGISCHE ASPEKTE 57

1. Determinanten externer Pharmaka 57

a. Wirkstoff 57
b. Galenik 58
c. Zusatzstoffe 58

2. Applikationsmodus 58

a. Vorbehandlung des Applikationsareals 58
b. Art des Auftrags 58
c. Verweildauer des Pharmakon-Reservoirs 58
d. Häufigkeit der Applikation 59

3. Absorptionsverbessernde Substanzen 59

VORBEMERKUNG

Die topische Anwendung von Pharmaka (sog. Externa) geht von der Vorstellung aus, daß die auf die Oberfläche der Haut applizierte Substanz die Möglichkeit besitzt, die integumentalen Barrieren zu durchdringen, um - je nach Indikation und Eindringtiefe -

- in den Schichten der Haut eine lokale

  und/oder

- im darunterliegenden Subkutangewebe eine lokale

  und/oder

- durch Aufnahme in das Gefäßsystem (Venen, Lymphgefäße) eine gesamtkörperliche (systemische)

therapeutische Wirkung zu entfalten.

Um Bedeutung bzw. Ausmaß des Eindringens einer Substanz in das Hüllorgan des Körpers richtig erfassen und bewerten zu können, ist es nötig, die anatomischen und physiologischen Grundlagen der Haut zu kennen.

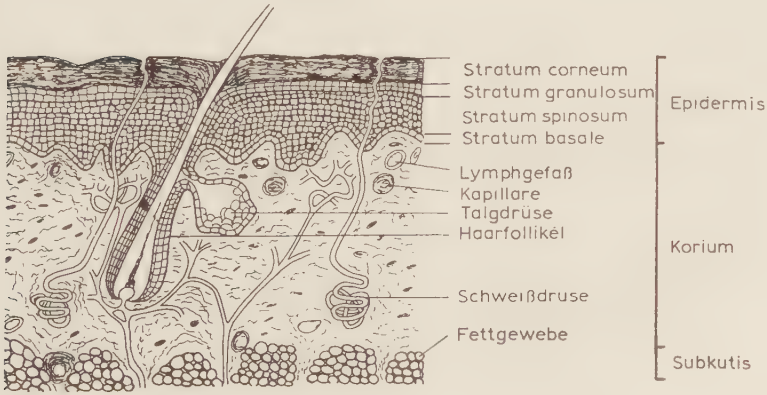
A. MORPHOLOGIE UND FUNKTION DER MENSCHLICHEN HAUT

I. ANATOMIE DER HAUT

Einen Überblick über den Schichtaufbau des beim Erwachsenen 1,6-2,0 m² messenden Hautorgans gibt Abb. 15.

Abb. 15: Aufbau der menschlichen Haut (schematisiert)

(Darstellung im histologischen Schnitt: siehe FIEDLER & LIEDER [105])



(Entnommen aus: PFEIFER, PFLEGEL und BORCHERT; a.a.O.; S. 72)

I. Die Bedeutung der einzelnen Strukturen sowie deren histologische und biochemische Details werden als bekannt vorausgesetzt.

Lediglich die wichtigsten Größenangaben seien an dieser Stelle wiedergegeben (nach LEONHARDT[112] sowie PFEIFER, PFLEGEL und BORCHERT[118]), da sie für die Diskussion des perkutanen Weges von Bedeutung sind:

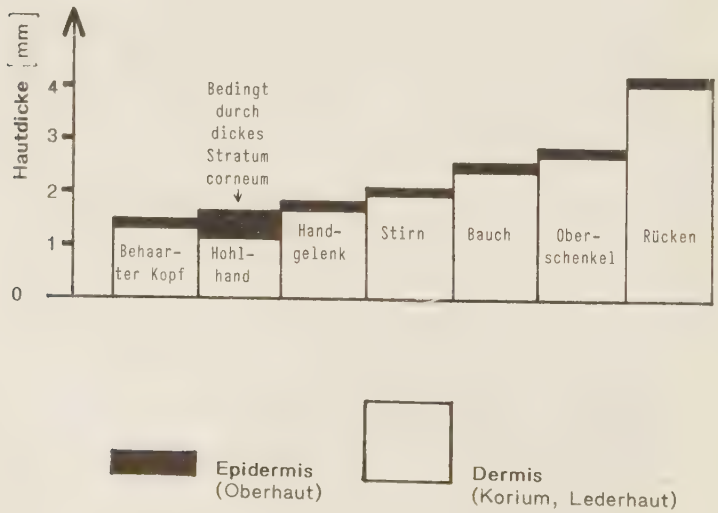
Dicke der Cutis (Epidermis + Korium): **1,5 - 4,0 mm**

davon entfallen auf die **Epidermis:** **0,03 - 0,2 mm**

Die Dicke der Epidermis unterliegt je nach Körperregion starken Schwankungen; insbesondere im Bereich der Hohlhand und der Fußsohle führt das dort sehr stark ausgebildete Stratum corneum (Schwielen!) zu Schichtdicken der Epidermis von 0,75 - 1,2 mm (bis zu 2 mm).

Die regional unterschiedliche Dicke der Haut veranschaulicht die Abb. 16. Die dargestellten Maße demonstrieren Durchschnittswerte.

Abb. 16: **Dicke der menschlichen Haut in Abhängigkeit von der Lokalisation** (Modifiziert nach ODLAND[116])



Es muß in diesem Zusammenhang betont werden, daß eine größere Dicke der Haut (oder einzelner ihrer Schichten) nicht zwangsläufig eine verminderte Permeabilität bedingen muß. So ist der physikalische Zustand der Region (z.B. Durchfeuchtung durch Drüsensekrete) oder das Wechselspiel von Applikat und Hautstruktur u.U. bedeutsamer für die Permeabilität als die reine Dicke (vgl. Seite 50 ff; siehe FELDMANN & MAIBACH[035]).

II. FUNKTIONEN DER HAUT

II.1. Physiologische Funktionen

In Anlehnung an LEONHARDT[112] und NASEMANN/SAUERBREY[115] sind für die menschliche Haut folgende physiologische Funktionen zu nennen:

① **Schutzfunktion**

Physikalischer Schutz (z.B. vor Druck, Licht, Wärme, Kälte etc.)

Chemischer Schutz (z.B. vor Wasser, Öl, Giften etc.)

Anti-infektiöser Schutz (vor Parasiten, Bakterien und Viren)

② **Regulationsfunktion**

Thermische Regulation

Regulation des Wasserhaushaltes

③ **Sensorische Funktion** < **protektiv** / **kognitiv-kommunikativ**

Die sensorischen Leistungen der Haut besitzen besondere Bedeutung bei der Wahrnehmung der Schutzfunktion, stellen darüberhinaus aber auch eine eigenständige Funktionsqualität dar, z.B. bei der Vermittlung emotionaler Reize im zwischenmenschlichen Kontakt.

④ **Organ-Funktion**

Physiologische Organfunktionen sind die sekretorischen Leistungen (Talg, Schweiß, Duftstoffe) sowie die hohe Selbstregenerationsfähigkeit.

Patho-physiologische Organfunktionen zeigen sich

- bei der immunbiologischen Manifestation von Infektionskrankheiten (z.B. Masern, Röteln etc.)
- bei Erkrankungen des Hautorgans selbst (z.B. Akne, Ekzem, Malignome etc.)
- bei Mitreaktionen im Rahmen allgemeiner Erkrankungen (z.B. Ikterus bei Lebererkrankungen etc.)

II.2. Pharmakodynamische Funktionen

Neben den physiologischen Aufgaben besitzt die Haut die Bedeutung eines Zielorgans respektive einer funktionellen Schleuse in Bezug auf die Applikation von Pharmaka.
Die Bedeutung der Haut als pharmakologisch-therapeutisches Zielorgan ist sowohl in ihrer Fläche (vgl. Seite 33) als auch ihrem Gewichtsanteil von ca. 10 % am Gesamtkörpergewicht begründet (siehe SCHAEFER, ZESCH & STÜTTGEN[122]).
Für extern applizierte Pharmaka zeigt die Haut drei prinzipielle Funktions-Qualitäten:

- Barriere-Funktion
- Kompartiment-Funktion
- Metabolische Funktion

II.2.a. Barriere-Funktion der Haut

Gemäß ihrer physiologischen Schutzfunktion setzt die Haut dem Eindringen eines auf ihrer Oberfläche aufgetragenen Pharmakons in ihren verschiedenen Schichten Widerstand entgegen.

Ungeachtet der Mechanismen (z.B. Diffusion, erleichterte Diffusion, passiver oder aktiver Transport etc.; vgl. Seite 47) und der Beeinflußbarkeit der Hautdurchlässigkeit (vgl. Seite 50 f) kommt dabei der Epidermis ein größerer Anteil am Barriere-Effekt zu als der Dermis, wobei unter den Schichten der Epidermis das **Stratum corneum** den **hauptsächlich limitierenden Faktor** darstellt (siehe Abb. 15, Seite 33; vgl. SCHEUPLEIN & BRONAUGH [123]).

Das morphologische Substrat der Barriere des Stratum corneum stellen 10-20 Lagen an verhornenden, verhornten bzw. abgestorbenen Epidermiszellen dar. Biochemisch läßt sich das Stratum corneum nach PFEIFER, PFLEGEL & BORCHERT [118] wie folgt charakterisieren:

15-20 % Lipide: Neutralfette und Cholesterol überwiegen gegenüber Phospholipiden.

40 % Skleroproteine: Es zählen hierzu Keratine, Kollagene und Elastine, wobei die Keratine die für die Haut maßgeblichste Gruppe darstellen (PSCHYREMBEL [119] sowie HARPER, LÖFFLER, PETRIDES & WEISS [108]).

ca. 40 % Wasser: Der Gehalt variiert je nach Feuchtigkeitsgehalt des umgebenden Mediums.
Die Quellfähigkeit der Hornschicht ist sehr ausgeprägt und wird von BARR [004] mit einer maximalen Wasseraufnahmefähigkeit von 1 µl pro cm^2 und h angegeben.

II.2.b. Kompartiment-Funktion der Haut

Auf dem Weg von der Oberfläche der Haut bis zur Übernahme ins Gefäßsystem ergeben sich für eine topisch applizierte Substanz verschiedene Möglichkeiten der vertikalen (antegrad und retrograd) und horizontalen Wanderungsrichtung sowie des mehr oder weniger langen Verbleibs in einem Verteilungsraum.

In erster Linie ist hier wiederum das **Stratum corneum** zu nennen. Es stellt ein **Reservoir** dar, das einerseits die Aufnahme eines Externums durch Bereitstellung des Pharmakons an tiefere Schichten ermöglicht, das aber andererseits im Sinne der Barriere das Rezipieren der applizierten Substanz limitiert (siehe Abschnitt II.2.a, oben).

Neben dem Stratum corneum wirkt die **Bindung** von eingewanderten Substanzen **an ortsständige oder fluide Matrices** ebenfalls im Sinne eines Kompartimentes. Im Vordergrund steht hier die Bindung an **Proteine**, darüberhinaus wird aber auch über die Bindung **an DNS** und **Melanin** berichtet (SCHAEFER, ZESCH & STÜTTGEN [122]).

Ein weiteres Kompartiment ergibt sich durch **Lösung** bzw. **Suspension** eines aufgenommenen Stoffes in präexistenten physiologischen Lösungsmedien wie Gewebssaft, Drüsensekret, Interzellularsubstanz etc.

II.2.c. Metabolische Funktion der Haut

Bei der Diskussion des perkutanen Weges sind stets auch digestive Vorgänge in Betracht zu ziehen. Es lassen sich dabei unterscheiden:

Aktiver Metabolismus

Nach DECKER [022] besitzt die Haut eigenständige metabolische Systeme. Verschiedene Forschergruppen konnten metabolische Leistungen der Haut nachweisen, so z.B. in Bezug auf Sexualhormone, Glucocorticoide, Salicylsäure u.a. Es handelt sich dabei um enzymatische Abbauvorgänge, die durch Identifizierung entsprechender Metabolite festgestellt werden konnten.

Passiver Metabolismus

Nach HERRMANN et al. [109] versteht man darunter Abbauvorgänge durch enzymatische Aktivitäten im Stratum corneum, wobei es sich um Restaktivitäten des tiefer lokalisierten aktiven Metabolismus handelt und nicht um ortsständige metabolische Systeme.

Chemische Zersetzung

Oxidation und Kondensation sind hier die wesentlichen Reaktionsformen. Untersuchungen existieren insbesondere zur Vitamin-A-Säure (SCHAEFER & ZESCH [081]) sowie zum Dithranol (FRANZ & IPPEN [040]).

Mikrobielle Zersetzung

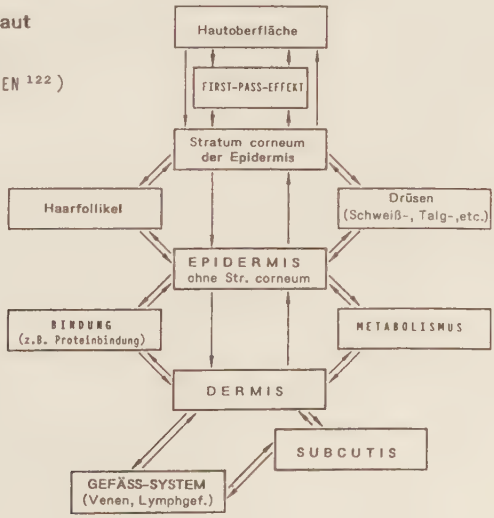
Dabei handelt es sich um Zersetzungsvorgänge, die strenggenommen nicht durch die Haut selbst, sondern durch Mikroorganismen ausgelöst werden, sei es im Rahmen der normalen Hautflora oder der pathologischen Besiedelung. Ein Beispiel hierzu ist die bakterielle Fettsäuren-Verstoffwechslung bei der Akne (MARPLES et al. [062,063]).

ZUSAMMENFASSUNG

Die morphologischen und funktionellen Verteilungsräume der Haut zeigt Abb.17 in schematischer Darstellung.

Abb. 17: Kompartimente der Haut

(Modifiziert nach SCHAEFER, ZESCH & STÜTTGEN [122])



B. WEGE DER PERKUTANEN PHARMAKON-AUFNAHME

Die Pharmakon-Aufnahme von der Hautoberfläche ins Gefäßsystem erfordert die Überwindung der gesamten gefäßlosen Epidermis-Schicht und das Eindringen ins Korium respektive in tiefere gefäßführende Strukturen.

Die am weitesten apikal liegenden Kapillarschlingen des Koriums nähern sich der Epidermis bis auf ca. 100 µm, sodaß sich bei einer Dicke der Epidermis von minimal 30 µm (vgl. Seite 34) eine perkutane Mindestwegstrecke für einen aufzunehmenden Stoff von etwa 130 µm ergibt (PFEIFER, PFLEGEL & BORCHERT[118]).

Nach Abb. 15 (Seite 33) sind für die Durchdringung der Epidermis drei grundsätzliche Wege möglich:

- Der transfollikuläre Weg
- Der transglanduläre Weg
- Der transepidermale Weg

I. PHARMAKON-AUFNAHME VIA HAUTANHANGSGEBILDE

Die Möglichkeit, ohne Durchdringung der epidermalen Zellverbände von der Hautoberfläche direkt ins Gefäßsystem zu gelangen, wird von SCHEUPLEIN & BRONAUGH[123] als "short-circuit diffusion pathways" oder auch als "diffusion shunts" bezeichnet.
Die zwei folgenden Wege bieten sich an:

I.1. Transfollikulärer Weg

Darunter versteht man die Substanz-Aufnahme durch Wanderung entlang der "Schiene" des Haarbalges und Übertritt ins gefäßführende Korium im Bereich des einschichtigen, nicht-verhornenden Epithels des Haarfollikels.

I.2. Transglandulärer Weg

Es handelt sich hierbei um den Aufnahmeweg, der retrograd über den Ausführungsgang von Drüsen (Schweiß-, Talg- und Duftdrüsen) via Sekret und Drüsenepithel Substanzen den Gefäßen des Koriums zuführt.

II. TRANSEPIDERMALE AUFNAHME

Dieser Terminus bezeichnet die Substanzaufnahme durch die in ihrer Kontinuität nicht durch Hautanhangsgebilde unterbrochene Epidermis.

In weiterer Differenzierung kann man den transepidermalen Aufnahmeprozeß trennen in **trans-zelluläre** und **trans-interzelluläre** Vorgänge. Auf eine derartige Unterscheidung soll aber in diesem Rahmen nicht weiter eingegangen werden.

III. QUANTITATIVE WERTUNG DER PERKUTANEN AUFNAHMEWEGE

Von den zuvor beschriebenen Wegen der perkutanen Pharmakon-Aufnahme stellt der **transepidermale Weg quantitativ** die mit Abstand **wichtigste Variante** dar.

Dies hat zwei Gründe:

- Zum einen beträgt der Flächenanteil der glandulären Hautanhangsgebilde in einem nicht-behaarten Hautareal nur 0,1 - 1 % (PFEIFER, PFLEGEL & BORCHERT [118]) bzw. alle Hautanhangsgebilde zusammen (Drüsen und Haarfollikel) weisen nur eine Flächendichte von ca. 10^{-3} cm^2 pro cm^2 Haut auf (SCHEUPLEIN & BRONAUGH [123]).

- Zum anderen stellen diese Strukturen kein beliebig durchlässiges offenporiges System dar, sondern zeigen durch die Anwesenheit von Keratin, Talg und Feuchtigkeit auch Barriere-Charakter (PASSOW [072] ; SCHEUPLEIN [082,083]).

Wenngleich der Anteil des nicht-epidermalen Stoffdurchtritts in der Endsumme vergleichsweise gering ist, darf nicht übersehen werden, daß diesen Wegen vor allem in der Frühphase der Aufnahme einer topisch applizierten Substanz Bedeutung zukommt, und daß das quantitative Ausmaß abhängig ist von der Art des angebotenen Pharmakons und dem ggf. verwendeten galenischen Vehikel (vgl. Seite 58; SCHEUPLEIN & BRONAUGH [123]).

C. TERMINOLOGIE DER PERKUTANEN PHARMAKON-AUFNAHME

Nachfolgend wird die terminologische Fassung von PFEIFER, PFLEGEL & BORCHERT[118] widergegeben, da im weiteren die dort gegebenen Begriffsbestimmungen verwendet werden:

I. DEFINITION DER PERKUTANEN ABSORPTION

"Unter **Absorption** (neuerdings häufiger anstelle von Resorption verwendet) ist die Aufnahme eines Stoffes aus dem Außenmilieu des Organismus oder von lokal begrenzten Applikationsorten im Körperinnern in die Blut- und Lymphbahn zu verstehen."

Anmerkung: Davon zu trennen ist der Begriff der Adsorption, die allgemein als physiko-chemische Akkumulation von Substanzen an andere Komponenten, üblicherweise von hohem Molekulargewicht, bezeichnet wird.

Die genannten Autoren subsummieren durch ihre Definition sowohl die **Aufnahme von Externa** (perkutane Absorption), die **Aufnahme von Interna** (bukkale, perlinguale, sublinguale, gastrale, intestinale Absorption) als auch **Sonderformen** wie nasale, otikale, pulmonale, vesikale, vaginale oder peritoneale Pharmakon-Aufnahme.

Der Themenstellung der vorliegenden Arbeit entsprechend beziehen sich die weiteren Ausführungen ausschließlich auf den Aspekt der perkutanen Absorption, kurz Absorption, ohne daß dies stets neu vermerkt ist.

Damit ein Stoff von der Oberfläche der Haut bis ins zentrale Kompartiment des Gefäßsystems gelangen kann, müssen folgende Teilvorgänge des Stofftransportes ablaufen:

I.1. Penetration

Penetration bezeichnet den **Eintritt** einer Substanz in eine bestimmte Schicht oder ein bestimmtes Organ.

(z.B. der Eintritt eines Stoffes vom epikutan aufgetragenen Reservoir in das Stratum corneum der Epidermis)

I.2. Permeation

Permeation beschreibt den **Durchtritt** durch eine Schicht mit Eintritt (Penetration) in eine nachfolgende, die sich von der ersten sowohl funktionell als auch strukturell unterscheidet.

(z.B. der Durchtritt eines Stoffes durch die Epidermis mit nachfolgendem Eindringen ins Korium)

Begriffliche Verwirrung entsteht teilweise durch die uneinheitliche Widergabe der Begriffe der angloamerikanischen Literatur im Deutschen: So wird engl. >resorption< oft mit dt. >Absorption<, und engl. >absorption< nicht selten mit dt. >Resorption< übersetzt. Dieser sprachlich nicht einleuchtenden Praxis folgt der Autor nicht, sondern bevorzugt die von oben genannten Autoren definierte Terminologie. (Zur sprachlichen Klärung siehe auch: PSCHYREMBEL[119]; UNSELD[127]; ROPER[120])
In konsequenter Folge kann man dann nach SCHAEFER, ZESCH & STÜTTGEN[122] den Begriff der >**Resorption**< als letzten Teilvorgang (nach Penetration u. Permeation) definieren:

I.3. Resorption

Resorption ist die Aufnahme einer Substanz ins Blut- bzw. Lymphsystem.

(z.B. die Aufnahme eines Stoffes vom Korium bzw. Subkutangewebe via Gefäßwand ins venöse System)

II. QUANTIFIZIERUNG DER PERKUTANEN DURCHLÄSSIGKEIT

Um perkutane Durchtrittsvorgänge auch quantitativ beschreiben zu können, ist es nötig, Maßbezeichnungen zu definieren, deren Eingangsgrößen möglichst einfach und der experimentellen Bestimmung zugänglich sind.

Diese Forderung erfüllen die von PRATZEL[139] geprägten Begriffe, die in der vorliegenden Arbeit als Grundlage für Berechnungen dienen, falls nicht aus gegebenen Gründen auf eine Quantifizierung der Meßergebnisse verzichtet wird.
Außerdem wurde gerade jenes Maßsystem ausgewählt, um Vergleiche mit den Ergebnissen aus den Arbeiten von GASTEIGER[135] und BRUCKBAUER[132] zu ermöglichen, die thematisch den vorliegenden Untersuchungen eng verwandt sind.

Es bedarf einer kurzen Erläuterung, daß nachfolgend stets der Begriff des perkutanen (Kutis = Epidermis + Korium) Transportes verwendet wird, die Definitionen von PRATZEL sich jedoch lediglich auf den epidermalen Durchtritt beziehen:

1. Wie bereits unter Abschnitt A.II.2.a (Seite 36) beschrieben, kommt der Epidermis die fundamentale Barrierefunktion beim Stoffdurchtritt durch die Haut zu.
2. Substanzen, die die epidermale Barriere überwunden haben, werden praktisch vollständig durch das Blut- und Lymphgefäßsystem aufgenommen (SCHAEFER, ZESCH & STÜTTGEN[122]).

Gleichsam pars pro toto können demzufolge die quantitativen Ansätze zum epidermalen Durchtritt nach PRATZEL ohne wesentlichen Fehler als repräsentativ für die g e s a m t e perkutane Aufnahme angesehen werden.

Für eine korrekte Vergleichbarkeit der im Anschluß beschriebenen Parameter sind - neben d e n Größen, die rechnerisch in die Formeln eingehen - als ergänzende Informationen zum experimentellen Procedere, dem die Werte entstammen, folgende Kriterien anzugeben:

- Konzentration des Stoffes im applizierten Pharmakon (z.B. Hirudingehalt in der aufgetragenen Hirudin-Rohextrakt-Salbe)
- Einwirkzeit des applizierten Pharmakons
- Einwirkungsmodus (Einreiben, Okklusivverband, Iontophorese etc.)
- Hautcharakteristik des Applikationsareals (Spezies, Körperregion, Dicke des Stratum corneum etc.)
- Vorratsmenge des applizierten Pharmakons bzw. des enthaltenen Wirkstoffes pro Flächeneinheit der Haut

  Bei der experimentellen Bestimmung der Permeationsparameter ist darauf zu achten, daß der epidermale Stoffdurchtritt nicht artefiziell limitiert wird durch eine zu geringe Vorratsmenge des applizierten Pharmakons (bzw. des darin enthaltenen Stoffes) pro Flächeneinheit der Haut, da dadurch fälschlich zu niedrige Permeationswerte für die zu untersuchende Substanz bestimmt würden.

II.1. Kumulative epidermale Durchtrittsgrößen

II.1.a. Haut-Permeation (HP)

Definition:

Die **Haut-Permeation HP** (auch >reale Haut-Permeation< genannt) ist der Quotient aus der nach der Zeit T durch die Epidermis hindurchgetretenen Menge m eines Stoffes und der epikutanen Applikationsfläche A.

als Formel:

$$HP(T) = \frac{m}{A}$$

T = Kumulationszeit, über die der Stoffdurchtritt gemessen wurde

m = Über die Hautfläche A hindurchgetretene Menge eines topisch applizierten Stoffes

A = Applikationsfläche

Benennung: $\left[\frac{g}{m^2}\right]$ oder umrechenbare Einheit

Die Messung genau derjenigen Menge m eines Stoffes, die über eine definierte Hautfläche A ins Gewebe respektive ins Gefäßsystem eingetreten ist, gestaltet sich experimentell meist äußerst schwierig.
Technisch unkompliziert ist dagegen eine renale Ausscheidungsmessung durchzuführen.
Aus diesem Grund findet sich bei PRATZEL[076] in Analogie zur >Haut-Permeation HP(T)< der Begriff der >renalen Elimination nach Permeation EP(T)< definiert:

II.1.b. Renale Elimination nach Permeation (EP)

Definition:

Die **renale Elimination nach Permeation EP** ist der Quotient aus der innerhalb der Zeit T im Urin gefundenen Menge m eines Stoffes und der Hautfläche A der epikutanen Applikation.

als Formel:

$$EP(T) = \frac{m_{elim.}}{A}$$

T = Kumulationszeit, über die die Elimination gemessen wurde

$m_{elim.}$ = Renal eliminierte Menge eines Stoffes nach topischer Applikation auf die Hautfläche A

A = Applikationsfläche

Benennung: wie oben

Abgesehen von den Fällen einer 100%igen renalen Elimination wird der EP(T)-Wert stets kleiner ausfallen als der HP(T)-Wert, da sich durch Distribution auf Körperkompartimente und andere Eliminationsformen (Faeces, Sekrete; nicht nachweisbare Metaboliten etc.) ein Teil des durch die Haut hindurchgetretenen Stoffes dem Nachweis im Urin entzieht.

II.1.c. Standard-Haut-Permeation (SHP)

Definition:

Die **Standard-Haut-Permeation SHP** ist der Quotient aus (realer) Haut-Permeation HP während der Zeit T und der Konzentration c des untersuchten Stoffes im applizierten Pharmakon.

als Formel:

$$SHP(T) = \frac{HP(T)}{c}$$

T = Kumulationszeit, über die der Stoffdurchtritt gemessen wurde

c = Konzentration des untersuchten Stoffes im applizierten Pharmakon

Benennung: $\left[\frac{°g}{m^2}\right]$ oder umrechenbare Einheit

Die SHP(T) gibt im Sinne einer **Clearance** an, wieviel Gramm Pharmakon (Wirkstoff + Träger) [°g] pro Hautfläche [m²] von dem im Pharmakon enthaltenen Wirkstoff [g] durch perkutane Absorption befreit werden.
Die Herleitung der Benennung verdeutlicht dies:

$$[SHP] = \left[\frac{\frac{g\ Stoff}{m^2\ Haut}}{\frac{g\ Stoff}{°g\ Pharmakon}}\right] = \left[\frac{°g\ Pharmakon}{m^2\ Haut}\right] = \left[\frac{°g}{m^2}\right]$$

Aus den in Abschnitt II.1.a (Seite 42) genannten Gründen lautet die analoge Definition bei renaler Eliminationsmessung:

II.1.d. Renale Standard-Elimination nach Permeation (SEP)

Definition:

Die **renale Standard-Elimination nach Permeation** SEP ist der Quotient aus der renalen Elimination nach Permeation EP während der Zeit T und der Konzentration c des untersuchten Stoffes im applizierten Pharmakon.

als Formel:

$$SEP(T) = \frac{EP(T)}{c}$$

T = Kumulationszeit, über die die Elimination gemessen wurde

c = Konzentration des untersuchten Stoffes im applizierten Pharmakon

Benennung: wie oben

II.2. Intervallbezogene epidermale Durchtrittsraten

Betrachtet man den epidermalen Stoffdurchtritt nicht summativ nach Ablauf der Gesamtbeobachtungszeit T, sondern kontinuierlich über einzelne Zeitintervalle hinweg, so lassen sich folgende Definitionen treffen:

II.2.a. Haut-Permeations-Rate (HPR)

Definiton:

Die **Haut-Permeations-Rate HPR** (auch reale Haut-Permeations-Rate genannt) ist der Quotient aus der innerhalb des Zeitintervalles t durch die Haut hindurchgetretenen Stoffmenge m und dem Produkt aus Applikationsfläche A und Intervallzeit t.

als Formel:

$$HPR(t) = \frac{m}{A \cdot t}$$

t = Intervallzeit, über die der Stoffdurchtritt gemessen wurde

m = Über die Hautfläche A hindurchgetretene Menge eines topisch applizierten Stoffes

A = Applikationsfläche A

Benennung: $\left[\frac{g}{m^2 \cdot h}\right]$ oder umrechenbare Einheit

Die HPR(t) besitzt die Bedeutung einer intervallbezogenen Momentaufnahme des Permeationsverhaltens eines Stoffes. Sie stellt die **Geschwindigkeit des perkutanen Massentransportes** dar.

In Analogie zu den kumulativen epidermalen Durchtrittsgrößen (Seite 42 und 43) lautet die sinngemäße Definition bei renaler Eliminationsmessung:

II.2.b. Renale Eliminations-Rate nach Permeation (ERP)

Definition:

Die **renale Eliminations-Rate nach Permeation ERP** ist der Quotient aus der im Zeitintervall t im Urin gefundenen Menge m eines Stoffes und dem Produkt aus Applikationsfläche A und Intervallzeit t.

als Formel:

$$ERP(t) = \frac{m_{elim.}}{A \cdot t}$$

t = Intervallzeit, über die die Elimination gemessen wurde

$m_{elim.}$ = Renal eliminierte Menge eines Stoffes nach topischer Applikation auf die Hautfläche A

A = Applikationsfläche

Benennung: wie oben

II.2.c. Standard-Haut-Permeations-Rate (SHPR)

Definition:

Die **Standard-Haut-Permeations-Rate SHPR** ist der Quotient aus Haut-Permeations-Rate HPR und Konzentration c des untersuchten Stoffes im applizierten Pharmakon.

als Formel:

$$SHPR(t) = \frac{HPR(t)}{c}$$

t = Intervallzeit, über die der Stoffdurchtritt gemessen wurde

c = Konzentration des untersuchten Stoffes im applizierten Pharmakon

Benennung: $\left[\frac{°g}{m^2 \cdot h}\right]$ oder umrechenbare Einheit

Das Zeichen ° bei der Gramm-Angabe weist darauf hin, daß es sich um eine Mengenangabe in Bezug auf das applizierte Pharmakon (z.B. Salbe) und n i c h t bezüglich des enthaltenen Wirkstoffes handelt.

In Konsequenz zur SHP(T) kann die SHPR(T) interpretiert werden als **Clearance-Geschwindigkeit** für ein betrachtetes Zeitintervall mit konstantem epidermalen Massenfluß (vgl. Seite 43).

Für Eliminationsmessungen lautet die entsprechende Definition:

II.2.d. Renale Standard-Eliminations-Rate nach Permeation (SERP)

Definition:

Die **renale Standard-Eliminations-Rate nach Permeation SERP** ist der Quotient aus der renalen Eliminations-Rate nach Permeation ERP im Zeitintervall t und der Konzentration c des untersuchten Stoffes im applizierten Pharmakon.

als Formel:

$$SERP(t) = \frac{ERP(t)}{c}$$

t = Intervallzeit, über die die Elimination gemessen wurde

c = Konzentration des untersuchten Stoffes im applizierten Pharmakon

Benennung: wie oben

II.3. Ergänzende Anmerkungen

Permeationsmessung über die renale Elimination

Abgesehen von den Fällen einer 100%igen (schnellen) renalen Elimination nach (langsamer) perkutaner Aufnahme werden die über renale Eliminationsmessung bestimmten Parameter EP, SEP, ERP und SERP stets kleiner ausfallen als die eigentlichen Permeationsparameter HP, SHP, HPR und SHPR.
Der Grund hierfür ist, daß sich durch Distribution auf Körperkompartimente und andere Eliminationsformen (Faeces, Sekrete; nicht nachweisbare Metaboliten etc.) ein Teil des durch die Haut hindurchgetretenen Stoffes dem Nachweis im Urin entzieht (vgl. Abb. 17, Seite 37).

Unter Anwendung pharmakodynamischer Modelle läßt sich von den durch Elimination bestimmten Parametern rechnerisch auf die eigentlichen Permeationsparameter rückschließen. Ein Eingehen darauf würde aber den gegebenen Rahmen sprengen; es wird diesbezüglich auf die Monographien von PRATZEL [076,139] sowie die Studie von PRATZEL, SEEMÜLLER, DODT & GEMMERLI [077] verwiesen.

Benennungen der Parameter

Der Zusatz "oder umrechenbare Einheit" im Anschluß an die Benennungsangabe bei den einzelnen Formeldarstellungen besagt, daß je nach Applikationsform (Lösung, Gel, Creme, Salbe etc.) und Nachweisverfahren auch andere als die angegebenen Benennungen möglich sind:

So z.B. Liter [l] bei Lösungen; die Umrechnung auf [g] kann über die Dichte erfolgen.
Oder z.B. Counts per minute [cpm] bei Versuchen mit radioaktiv markierten Applikaten; die Umrechnung ist hier über die spezifische Aktivität [cpm/l] bzw. [cpm/g] möglich.

Beispiele für die Verwendung derartiger Benennungen sowie entsprechende Versuchsdaten zeigen die Arbeiten von BRUCKBAUER [132] und GASTEIGER [135].

Mathematischer Ausblick

Aus der Sicht der Differential- und Integralrechnung bestehen zwischen den kumulativen Parametern und den entsprechenden intervallbezogenen Raten folgende Zusammenhänge:

$$\int_0^T HPR(t) = HP(T) \qquad \text{(Analog für SHPR / SHP)}$$

sowie

$$\int_0^T ERP(t) = EP(T) \qquad \text{(Analog für SERP / SEP)}$$

mit T = Kumulationszeit
t = Intervallzeit

D. FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DES PERKUTANEN STOFFDURCHTRITTS

I. TRANSPORTMECHANISMEN ÜBER BIOLOGISCHE GRENZSTRUKTUREN

Es sind dabei zwei grundsätzliche Wege zu unterscheiden:

Zum einen der Durchtritt durch die Zellzwischenräume und zum anderen der Durchtritt durch die zellulären Strukturen selbst des biologischen Grenzmaterials.

I.1. Interzelluläre Transportmechanismen

Die Überwindung der Zellzwischenräume kann geschehen durch:

- Passive Diffusion durch interzelluläre Poren
- Passive Filtration durch interzelluläre Poren
- Persorption (Sonderform der intestinalen Stoffaufnahme via Epitheldefekte)

I.2. Intrazelluläre Transportmechanismen

Die Durchdringung zellulärer Strukturen kann erfolgen durch:

- Transzelluläre passive Diffusion
  - Transmembranöse Lipiddiffusion
  - Diffusion durch Membranporen
- Carrier-vermittelte Transportprozesse
  - Erleichterte Diffusion
  - Aktiver Transport
- Pinozytose und Zytopempsis
- Ionenpaartransport

Zur detaillierten Erläuterung der Begriffe wird auf die einschlägige Literatur verwiesen, insbesondere auf PFEIFER, PFLEGEL & BORCHERT [118], an deren Ausführungen sich obige Darstellung anlehnt.

II. MECHANISMEN BEI PERKUTANEN TRANSPORTPROZESSEN

Nach den eben genannten Autoren geschieht die **Pharmakon-Aufnahme durch die Haut** in einem **passiven Transportprozess.**

Dabei spielt unter den Formen des nicht-aktiven Transportes wie

- Interzelluläre passive Porendiffusion
- Interzelluläre passive Porenfiltration
- Transzelluläre passive Diffusion

die letztgenannte Möglichkeit in Form der **transmembranösen Lipiddiffusion die bedeutendste Rolle**, da sich die Haut (und hier in erster Linie die Epidermis) mikromorphologisch, abgesehen von den Hautanhangsgebilden und pathologischen Kontinuitätsunterbrechungen, wie eine porenfreie Barriere verhält.

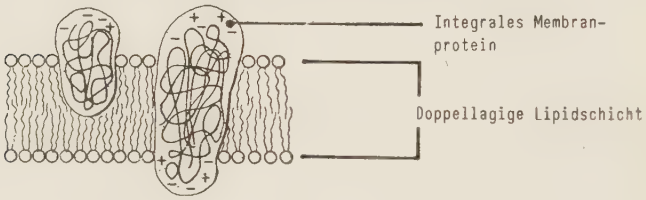
II.1. Morphologische Grundlagen der transmembranösen Lipiddiffusion

Die transmembranöse Lipiddiffusion trägt ihren Namen aufgrund der Tatsache, daß die wesentliche Barriere des transzellulären Weges im Durchtritt durch die Zellwände (Zellmembranen) besteht, die einen komplexen Aufbau aus einer **Lipid**doppelschicht zeigen (SCHEUPLEIN & BRONAUGH[123]).

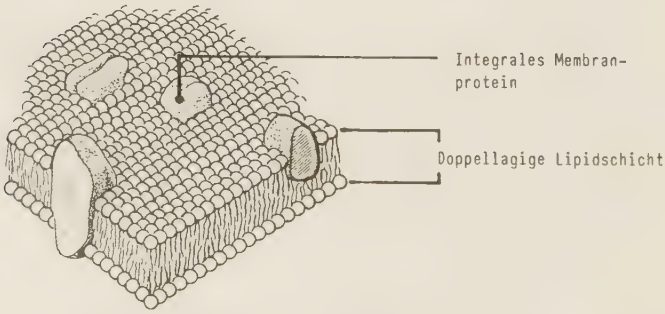
Die Grundlagen des Aufbaus biologischer Membranen sind in der "Unit-Membrane"-Hypothese von DAVSON, DANIELLI und ROBERTSON vorgegeben; die wesentlichen Charakteristika der modifizierten Weiterentwicklung des Modells zeigt die Abb. 18 nach SINGER & NICOLSON[086].

Abb. 18: Biomembran-Modell mit Doppellipidschicht und integralen Proteinen

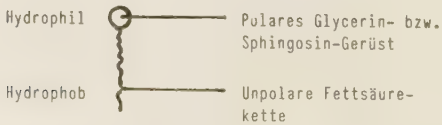
a) Querschnitt durch eine Biomembran



b) Schrägaufsicht auf eine Biomembran



c) Symbol-legende:



(Modifiziert nach: HARPER, LÖFFLER, PETRIDES, WEISS, a.a.O., S.68)

II.2. Quantifizierende Beschreibung des Diffusions-Vorganges

Zur mathematisch-physikalischen Beschreibung des (passiven) Diffusions-Vorganges wird in der Literatur stets das **1. FICKsche Diffusionsgesetz** zitiert:

$$\frac{dQ}{dt} = -D \cdot F \cdot \frac{dc}{dx}$$

Es bedeuten dabei:

$\frac{dQ}{dt}$ = je Zeiteinheit diffundierte Stoffmenge

D = Diffusionskoeffizient

F = Diffusionsfläche

$\frac{dc}{dx}$ = wirksamer Konzentrationsgradient

Der in vivo gegebenen Komplexität des Diffusions-Vorganges kann diese einfache formelhafte Beschreibung mit nur wenigen Eingangsparametern lediglich näherungsweise Rechnung tragen.

Auf die Möglichkeit, den Diffusions-Vorgang theoretisch exakter (und damit natürlich auch sehr viel umfangreicher) zu beschreiben, soll hier nur am Rande verwiesen werden (siehe SCHAEFER, ZESCH & STÜTTGEN: Begriff des >Flux< [122]).

II.3. Inverse Penetration

Perkutane Transportvorgänge können sich nicht nur mit der Zielrichtung der Resorption zentripedal, sondern ebenso in umgekehrter Richtung zentrifugal vollziehen: Dieser Vorgang wird durch den Begriff der **inversen Penetration** beschrieben (SCHAEFER, ZESCH & STÜTTGEN [122]). Die Existenz dieser Möglichkeit ist in Abb. 17 (Seite 37) durch die Beidseitigkeit der eingetragenen Pfeilrichtungen angedeutet.

Den Prototyp der inversen Penetration liefert die parenterale (i.v., i.a. etc.) Applikation eines Pharmakons mit nachfolgender Diffusion des verabreichten Stoffes vom Intravasalraum via Kapillarwände ins Subcutangewebe, Corium und gegebenenfalls in noch oberflächennähere Hautschichten.

Auch bei der perkutanen Absorption nach topischer Pharmakon-Applikation besteht die Möglichkeit der inversen Penetration, z.B. wenn sich durch Kompartimentfunktionen Konzentrationsgradienten aufbauen, deren Richtung der Ausgangssituation entgegengesetzt ist.

E. VARIATIONSPARAMETER INTEGUMENTALER DURCHLÄSSIGKEIT

Wie bereits erwähnt, beruht die Barriere-Funktion der Haut weitgehend auf der intakten Struktur des Stratum corneum. Läsionen in diesem Bereich (und natürlich auch in den übrigen dermalen Schichten) führen in der Regel zu einer vermehrten kutanen Durchlässigkeit.

Es lassen sich unterschiedliche Läsionsformen unterscheiden, wobei >Läsion< nicht nur im pathologischen Sinn (traumatisch, toxisch etc.) zu verstehen ist, sondern auch Folge einer physiologischen oder therapeutischen Einwirkung (z.B. Hornschichtquellung durch Feuchtigkeit beim Baden) sein kann.

Aufgrund der vielen Möglichkeiten der kutanen Alteration beschränken sich die folgenden Ausführungen in Form eines kursorischen Überblicks auf die Angabe des einwirkenden Agens (ohne Anspruch auf Vollständigkeit) und den Verweis auf entsprechende Autoren, die die Einflüsse untersuchten.

Daneben sind auch Parameter berücksichtigt, die nicht aufgrund externer Beeinflussung, sondern individualtypisch die Hautdurchlässigkeit beeinflussen.

I. PHYSIKALISCHE VARIATIONSPARAMETER

I.1. Mechanische Einflüsse

I.1.a. Druck und Zug

Druck- und Zugkräfte, wie sie beim Einreiben und beim Massieren der Haut auftreten, können auf zweierlei Weise absorptionsverändernd (meist fördernd) wirken:

- Durch Auflösung interzellulärer Verbindungen (→ artefizielle interzelluläre Poren!)
- Durch Veränderung der normalerweise negativen Ladung der Hautoberfläche

(SCHAEFER, ZESCH & STÜTTGEN[122]; STÜTTGEN[124])

I.1.b. Enthaarung

Durch die epidermalen Mikrotraumata, die bei der Enthaarung gesetzt werden, kann die perkutane Absorption um ein beträchtliches Maß im Sinne einer Shunt-Aufnahme ansteigen (vgl. Abschnitt B.I, Seite 38).

Die Ergebnisse sind dabei abhängig von der Art der Enthaarung (z.B. mechanische Depilierung, Rasur, Anwendung einer Enthaarungscreme etc.).

(JÄCKER, KEMPER, LÜPKE & RUSCHE[053]; SCOTT[085]; BRUCKBAUER[132])

I.1.c. Klebestreifen-Stripping

Durch wiederholtes Aufbringen einer selbstklebenden Folie (z.B. Tesa-Film) auf die Hautoberfläche und anschließende Ablösung läßt sich das Stratum corneum schichtweise reduzieren.

Es besteht unterschiedliche Ansicht darüber, ob sich die Hornschicht bei entsprechend häufiger (ca. 30 - 40 maliger) Anwendung des Verfahrens gänzlich oder nur bis zu maximal 3/4 entfernen läßt.

I.1.c. Die Methode des Klebestreifen-Stripping besitzt aus experimenteller Sicht mehrfache Bedeutung:

- Gezielte schichtweis-sukzessive Reduktion des Stratum corneum
- Auflockerung der Zellverbände bis hin in die tiefere Epidermis mit Schaffung interzellulärer Poren
- Induktion einer erhöhten Regenerationsleistung im Stratum granulosum (Mitose-Rate steigt)

Ungeachtet der Einzelaspekte resultiert eine erhöhte Permeabilität.

(WOLF [097]; PINKUS [073,074] ; HOLYO-TOMOKA & KLIGMAN [051] ; FELDMANN & MAIBACH [034]; CHRISTOPHERS & BRAUN-FALCO [019])

I.2. Ultraschall-Einwirkung (Phonophorese)

Die Wirkung von Ultraschall (mit Frequenzen im MHz-Bereich) auf Gewebe beruht auf einer Aktivierung der Atome und Moleküle zu intensiverem Schwingungsverhalten, was zu Reibeffekten im molekularen Bereich und damit zu Lockerungen im interzellulären Verband sowie zu Wärmeentwicklung führt.
Sowohl die mikromorphologische Gewebsauflockerung als auch die thermische Beeinflussung (siehe unten) wirken sich im Hinblick auf die perkutane Absorption aus. Eine Erhöhung derselben konnte bei Ultraschall-Einwirkung für bestimmte Substanzen nachgewiesen werden.

(GRIFFIN & TOUCHSTONE [045] ; NOVAK [068] ;GILLMANN [107])

I.3. Thermische Einflüsse

Aufgrund der Abhängigkeit der Diffusionskonstanten D (vgl. Seite 49) von der (absoluten) Temperatur T gemäß der Beziehung

$$D = \frac{R \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot N}$$

mit
R = allgemeine Gaskonstante
T = absolute Temperatur
η = Viskositätskonstante des diffundierten Mediums
r = Molekülradius der diffundierenden Substanz
N = LOSCHMIDTsche Zahl

ergibt sich demzufolge auch eine Variabilität der perkutanen Diffusionsvorgänge bei sich ändernder Temperatur:

1.3. Bei höherer Temperatur resultiert ein gesteigerter perkutaner Massenfluß, wobei dieser Steigerung Grenzen gesetzt sind durch Denaturierungsvorgänge oberhalb physiologisch akzeptabler Temperaturen. Ab 65°C ließen sich zum Beispiel irreversible strukturelle Veränderungen der menschlichen Haut nachweisen, die zu einer beträchtlichen Minderung der Schrankenfunktion führen.

Die temperaturbedingte erhöhte Hautpermeabilität erfährt eine zusätzliche Steigerung durch die im Rahmen der Regulationsfunktion verstärkt einsetzende Schweißproduktion, die zu einer Hydratation der Haut führt (vgl. Seite 53).

Darüberhinaus erfährt die vasale Resorption ebenfalls eine wärmebedingte Steigerung aufgrund der Zunahme der kapillären Durchblutung.

Entsprechende therapeutische Maßnahmen wie Salbenapplikation plus Wärmeanwendung, Fangopackung, Warmbad mit Badezusatz etc. nutzen die beschriebenen Effekte.

(BLANK, SCHEUPLEIN & MACFARLANE [013]; ALLENBY, FLETCHER, SCHOCK & TEES [001]; BUCHTELA & HACKL [016]; CUMMINGS [020])

1.4. Einflüsse durch elektrischen Strom

Die zwei prinzipiellen Arten des elektrischen Stromflusses, Gleichstrom und Wechselstrom, bedingen unterschiedliche Formen der Förderung perkutaner Aufnahmevorgänge:

Gleichstrom: (Anwendung im mA-Bereich pro cm^2)

Man spricht bei seiner Anwendung von **Iontophorese**, sofern dissoziierte ionische Verbindungen zur Anwendung kommen, und von **Elektro-Osmose**, wenn undissoziierte polare Verbindungen zur Wanderung ins Spannungsfeld eingebracht werden.

Wechselstrom: (Anwendung im Bereich von 50 bis etwa 5000 Hz)

Je nach Schwingungszahl spricht man vom **Niederfrequenz-Bereich** (hauptsächlich 50 - 100 Hz; sog. diadynamische Ströme) und vom **Mittelfrequenz-Bereich** (ab 1000 Hz).
Die Folgen bestehen in einer Einflußnahme auf das Zellpotential der Hautzellen, in einer unterschwelligen Reizung sensibler kutaner Nerven mit analgetischem Effekt sowie in einer hyperämisierenden Wirkung (vgl. oben).

Sowohl die Einzelanwendung als auch die Kombination der Stromqualitäten miteinander findet Anwendung in der physikalischen Therapie.

(GILLMANN [107]; HILL, GANGAROSA & PARK [050])

I.5. Einfluß der Hautdurchfeuchtung (Hydratation)

Normalerweise beträgt der Wassergehalt der Haut 5-15 %. Dieser Gewichtsanteil kann sich bei entsprechenden Maßnahmen bis auf 50 % steigern, wobei neben der Hornschicht auch die tieferen Epidermis-Schichten eine Quellung erfahren können.

Zwei Formen der Steigerung des kutanen Wassergehaltes sind sowohl experimentell als auch therapeutisch relevant:

- Ganz- bzw. Teilkörperbad
- Okklusivverband

Die Steigerung der perkutanen Durchlässigkeit ist dabei vom jeweiligen Pharmakon und dessen chemischen Eigenschaften abhängig.

Es muß betont werden, daß ein Bad zwar eine Absorptionssteigerung verursachen kann (z.B. bei Schwefel), jedoch **nicht zwangsläufig** zu einer signifikanten Inkorporation des umgebenden Mediums führen muß. Gerade die Aufnahme von Ionen in mineralischen Bädern beträgt oft nur unbedeutende Bruchteile des Körper-Tagesumsatzes dieses Ions (z.B. trifft dies zu für Na^+, Cl^-, SO_4^{--} u.a.).

Okklusivverbände führen in der Mehrzahl der Fälle zu einer gesteigerten Substanzaufnahme durch die Haut; bei längerdauernder Verweilzeit des Verbandes müssen aber Nebeneffekte (meist permeabilitätssteigernd!) wie Entzündung und/oder Besiedelung durch Mikroorganismen mitberücksichtigt werden.

Als wirksame Mechanismen bei der Hydratation der Haut werden neben Zellverband-lösenden Quellungseffekten auch Änderungen im Membranpotential durch Ionenverschiebungen, osmotische Prozesse und Einflüsse auf die Mitose-Rate diskutiert.

(BLANK & SCHEUPLEIN [012]; HARTMANN [047]; DIRNAGL & DREXEL [025]; FISHER & MAIBACH [038]; DREXEL, DIRNAGL & PRATZEL [028]; MATOLTSY, DOWNES & SWEENEY [064]; SINGER & VINSON [087]; DEMSKI, DEMARCO & MARCUS [023])

II. CHEMISCHE VARIATIONSPARAMETER

II.1. pH-Wert - Bedeutung und Beeinflußbarkeit

Ein wesentlicher Faktor chemischer Beeinflußbarkeit der Hautpermeabilität ist der pH-Wert.

Physiologischerweise zeigt die Hautoberfläche einen leicht bis mittelgradig sauren pH-Wert zwischen 4 und 6, den sog. **"physiologischen Säuremantel"**, der nur in den Regionen apokriner Drüsen durch neutral bis leicht alkalisch reagierende Areale unterbrochen ist.

Der beträchtliche Anteil an Proteinen (siehe Seite 36) verleiht der Haut Puffer-Eigenschaften, die äußerliche Einflüsse im pH-Bereich von etwa pH 3 bis pH 11 auszugleichen vermögen. Eine bedeutende Rolle spielt dabei das Keratin mit seinem isoelektrischen Punkt um pH 4.

Die augenfälligste **Beeinflussung** des kutanen pH-Wertes stellt die Anwendung von Seifen und sonstigen Reinigungsmitteln dar. Es konnte experimentell gezeigt werden, daß durch Seifenvorbehandlung der Haut eine Steigerung der Durchlässigkeit für bestimmte Substanzen erreicht werden kann.

Dabei kommt den pH-Veränderungen eine eher geringe Bedeutung zu im Vergleich zu den Veränderungen der kutanen Molekularstruktur respektive der Oberflächenspannung im Zusammenhang mit der Anwendung waschaktiver Substanzen (siehe hierzu Abschnitt E.II.2 im Anschluß).

(ALLENBY, FLETCHER, SCHOCK & TEES [001] ; MORIYAMA [067] ; NASEMANN & SAUERBREY [115]; WAHLBERG [092])

II.2. Bedeutung oberflächenaktiver Substanzen

Unter **oberflächenaktiven Substanzen** (Synonyma sind: waschaktive Substanzen, Seifen, Surfactants, Detergentien, Netzmittel, Tenside) versteht man chemische Verbindungen, die in gelöster Form einen asymmetrischen Aufbau aus einer polaren hydrophilen und einer apolaren hydrophoben Seitenkette aufweisen.
Sie wirken dadurch als Vermittler zwischen wäßriger Phase und Lipiden und ermöglichen so Reinigungsprozesse.

Aufgrund der weiten Verbreitung dieser Substanzen in den diversen Körper-)Reinigungs- und sonstigen Pflegemitteln sowie aufgrund ihrer Wirksamkeit in vergleichsweise geringen Konzentrationen halten SCHEUPLEIN & BRONAUGH [123] die Surfactants für "perhaps the most potentially damaging of all substances routinely applied to the skin".

Die Vulnerabilität der membranösen Intaktheit der Haut durch waschaktive Substanzen der beschriebenen Art wird verständlich, vergleicht man ihre asymmetrisch-polare Konfiguration mit dem ebenfalls elektrisch strukturierten Aufbau biologischer Membranen (vgl. Abb. 18, Seite 48).

(BETTLEY [007,008,009]; BETTLEY & DONOGHUE [010] ; BLANK [011] ; DUGARD & SCHEUPLEIN [029] ; FREDERIKSSON [041,042] ; LANSDOWM & GRASSO [056] ; SCHEUPLEIN & ROSS [084]; SCALA, McKOSKER & RELLER [080] ; WACHTER & HAUSEN [130])

II.3. Toxische Einflüsse

Grundsätzlich kann man unterscheiden zwischen toxischen (hier: insbesondere hautschädlichen) Effekten, die für eine Substanz obligat sind, da sie a priori als Schadstoff wirkt, und unerwünschten lokalen wie systemischen Wirkungen bis hin zur Vergiftung durch Stoffe, die unter medikamentöser oder kosmetischer Indikation eingesetzt werden.

II.3.a. Schadstoffe

Hierzu sollen beispielhaft genannt werden:

Pestizide, Herbizide, organische Lösungsmittel, Rückstände von Verbrennungsvorgängen, Teerprodukte und Schwermetalle.

Die kutanen Alterationen bei Einwirkung entsprechender Schadstoffe bieten unterschiedliche Bilder:
Von der Einlagerung in die Haut (z.B. Hydrargyrosis durch Quecksilber) über die Induktion struktureller Veränderungen (z.B. Akne durch Chlor) und die Ausschaltung der Barriere-Funktion (z.B. bei Insektiziden durch die hohe Lipophilie) bis hin zu Störungen der metabolischen Zellfunktionen (z.B. bei Kampfgiften) und karzinogenen Wirkungen (z.B. bei Teerprodukten) reicht die Variationsbreite der Schädigungsmöglichkeiten.

(ORFANOS & STRUNK [069]; VALENTIN et. al.[128,129]; FELDMANN & MAIBACH [036])

II.3.b. Medikamente

Wiederum nur in exemplarischer Auswahl erfolgt die Auflistung einiger Medikamente und ihrer schädigenden Einflüsse auf die Haut:

- **Zytostatika** (lokale als auch systemische Anwendung)
  - Schädigung der Hautanhangsgebilde (Alopezie)
  - Schädigung des Kapillarsystems (Schleimhautblutungen)
  - Hyperpigmentierungen
  - Dermatitis

- **Antibiotika** (lokale Anwendung)
  - Kutane (und systemische) Sensibilisierung
  - Lokale Reizerscheinungen im Sinne einer Dermatitis

- **Corticosteroide** (lokale Anwendung)
  - Hautatrophie
  - Minderung der Haut-Barrierefunktion gegenüber Krankeitserregern

FALKSON & SCHULTZ [033]; KUSCHINSKY, LÜLLMANN & PETERS [111]; WELLHÖHNER [131])

II.3.c. Desinfektionsmittel, Hautpflegemittel und Kosmetika

Eine häufige und intensive Anwendung birgt die Gefahren der Sensibilisierung (kutan als auch systemisch) und toxischer Effekte.
Man hat zu rechnen mit gesteigerter perkutaner Aufnahme nach längerer Anwendung aufgrund von Hautalterationen respektive einer a priori hohen Absorption durch entsprechende chemische Beschaffenheit der Substanz bzw. der Vorschädigung der Haut im Rahmen der Indikation zur Anwendung (z.B. Rhagaden, Dermatitis etc.).
Umfangreiches Untersuchungsmaterial liegt z.B. vor zum Hexachlorophen.

(BYE, MORISON & RHODES [017]; CHILCOTE, CURLEY, LOUGHLIN & JUPIN [018]; FERRY & ROBERTS [037])

III. INDIVIDUELLE VARIATIONSPARAMETER

Beim Vergleich der kutanen Durchlässigkeit für eine bestimmte Substanz bei verschiedenen Probanden sind auch bei Konstanz der experimentellen Bedingungen individuelle Variationen möglich.
Es können hier nur Kriterien kutaner Individualität aufgezählt werden; eine Beurteilung ihrer Bedeutung kann allein im Zusammenhang mit dem jeweiligen Experiment erfolgen.

III.1. Biologische Einflußgrößen

Zu den individualtypischen Kriterien zählen:

Alter	Hier ist vor allem das Säuglings- und frühe Kindesalter aufgrund seiner stark erhöhten perkutanen Absorptionsfähigkeit von Interesse; im späteren Lebensalter sind die altersabhängigen Variationen von geringerer Bedeutung.
Geschlecht	Es besitzt Einfluß auf die Hautdicke und ist verantwortlich für hormonell bedingte Veränderungen, wobei insbesondere Schwangerschaft und Klimakterium zu nennen sind.
Hauttyp und körperregionale Unterschiede	Als bestimmende Faktoren sind hier zu erwähnen: Hautdicke, Pigmentierungsgrad (besondere Bedeutung rassischer Einflüsse hierbei!), Durchfeuchtungsgrad, Dichte der Hautanhangsgebilde (Haare, Drüsen) und sekretorisches Zustandsbild (Seborrhoe - normal - Sebostase).
Hautbelastung/Hautpflege	Von besonderer Bedeutung sind Faktoren wie mechanische Belastung, Mikrowunden/Rhagaden, Insolation, Anwendung von Reinigungs- und Pflegesubstanzen.
Mikrobielle Hautflora	Sie zeigt eine individuell chakteristische Zusammensetzung und spielt vor allem im Zusammenhang des kutanen Metabolismus eine bedeutende Rolle.

III.2. Pathologische Determinanten

Krankheitsbedingte Veränderungen der Haut können nahezu jeden physikalischen und chemischen permeabilitätsbestimmenden Parameter beeinflussen:

Angefangen von der Dicke des Stratum corneum (z.B. Hyperkeratose bei Ichthyosis) über den Durchfeuchtungsgrad (z.B. Hyperhidrosis) und Formen zellulärer Degeneration (z.B. Acrodermatitis chronica atrophicans nach HERXHEIMER) bis hin zur mikrobiellen Besiedelung und Destruktion (z.B. Akne conglobata, Erysipel, Mykosen, kutane Tbc etc.) lassen sich beliebig Beispiele für pathologische kutane Alterationen anführen.

Die oftmals gesteigerte Permeabilität der krankhaft veränderten Haut kann sich sowohl als begünstigender (z.B. verbessertes Eindringen von Salben, Cremes etc.) als auch komplizierender Aspekt (z.B. Gefahr einer systemischen Nebenwirkung) der Anwendung von Externa erweisen.

(ANDERSON [002]; BAILLIE [003]; MAHRLE & ORFANOS [058]; OWENS, OGURA, KNOX [070]; PASCHER & BERGER [071])

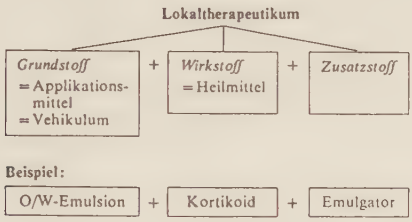
IV. PHARMAKOLOGISCHE ASPEKTE

Die bisher dargestellten physikalischen, chemischen und individuellen Variationsparameter der integumentalen Durchlässigkeit besitzen alle Bedeutung für die topische Anwendung eines Pharmakons.

Darüberhinaus erfordert die lokale dermatologische Therapie aber auch die Kenntnis der Eigengesetzlichkeit externer Pharmaka, deren Grundlagen nachfolgend kurz dargestellt werden sollen.

VI.1. Determinanten externer Pharmaka

Abb. 19: Aufbauprinzip dermatologischer Lokaltherapeutika



(Entnommen aus: NASEMANN & SAUERBREY; a.a.O.; Seite 389)

In entsprechenden Fällen kann auf jeweils eine der drei Komponenten verzichtet werden:

- **Zusatzstoffe** wie Geruchskorrigentien u.a. sind bei manchen Grund- und Wirkstoffen überflüssig.
- Der **Grundstoff** kann entfallen, wenn der Wirkstoff keines galenischen Vehikels bedarf.
- Selbst das Fehlen eines **spezifischen Wirkstoffes** ist möglich, wenn der unspezifische Grundstoff bereits therapeutische Wirkung entfaltet (z.B. kühlendes Gel bei Sportverletzungen).

In der Regel zeigen Externa aber einen Aufbau aus mehreren Komponenten mit den zuvor beschriebenen Funktionen. Jede dieser Komponenten besitzt ihrerseits Einflüsse auf die perkutane Durchlässigkeit.

IV.1.a. Wirkstoff

Aufgrund des Aufbaus biologischer Membranen (vgl. Abb. 18, Seite 48) ist es evident, daß die stoffliche Beschaffenheit eines Wirkstoffes von wesentlicher Bedeutung für dessen perkutane Aufnahme ist, da Eigenschaften wie Protein oder Nicht-Protein, Aggregatzustand, Molekülgröße, elektrische Ladung oder Neutralität, Van-der-Waal`sche Kräfte, Viskosität, Säure- oder Base-Funktion usw. bestimmend für die Interaktion mit den biologischen Grenzstrukturen sind.

IV.1.b. Galenik

Neben der stofflichen Eigenheit des Wirkstoffes selbst ist die **Galenik** eines Pharmakons von Bedeutung; man versteht darunter die **"molekulare Verpackung"** (physikalisch wie chemisch) **eines Wirkstoffes** im **Grundstoff** (und gegenenfalls Zusatzstoff).

Von entscheidender Bedeutung ist dabei die Freisetzbarkeit des Heilmittels aus seinem V e h i k e l (Träger):
Eine die Haut gut penetrierende und permeierende Substanz kann diesen Vorgang nicht vollziehen, wenn sie von dem auf der Hautoberfläche befindlichen Vehikel chemisch oder physikalisch zu stark gebunden wird.

(BARRET, HADGRAFT & SARKANY [005]; BAUER [006]; FRANKE-AUGST, SPEISER & LUTZ [039]; ZESCH [098]; ZESCH & SCHAEFER [099])

IV.1.c. Zusatzstoffe

Für diese Adjuvantien gelten die Ausführungen von Abschnitt IV.1.b (siehe oben) sinngemäß.

Bei ihrer Auswahl muß man bestrebt sein, möglichst inerte Substanzen zu verwenden, die nicht ihrerseits unerwünschte und unkontrollierte Effekte auslösen. Als Negativ-Beispiel ist hier die allergisierende, inflammatorische oder toxische Potenz von Zusatzstoffen zu nennen.

(BOGS & NAUMANN [014]; LARSON [057]; POWERS & FOX [075])

IV.2. **Applikationsmodus**

Neben der Galenik nimmt auch die Art der Anwendung eines Externums entscheidenden Einfluß auf dessen perkutane Absorption.

IV.2.a. Vorbehandlung des Applikationsareals

Baden, Bürsten, Massieren, Rasieren etc. sind vorbereitende (und teilweise auch begleitende) Maßnahmen der externen Pharmakon-Anwendung, die nach Abschnitt E.I (Seite 50 ff) üblicherweise zu erhöhter perkutaner Aufnahme führen.

IV.2.b. Art des Auftrags

Für die perkutane Absorption ist von erheblichem Einfluß, ob der Auftrag eines Externums durch Auftropfen, Bestreichen, Einmassieren oder in sonstigen Variationen erfolgt.

Ferner wird das Ausmaß der Absorption durch Anlage eines Verbandes (trockener Verband, feuchter Verband, Reservoir-Verband, Okklusiv-Verband etc.) verändert.

Die Auswirkungen der zusätzlichen Anwendung einer physikalischen Maßnahme wie Ultraschall, Wärme, Strom etc. sind im Abschnitt E.I (Seite 50 ff) beschrieben.

IV.2.c. Verweildauer des Pharmakon-Reservoirs

Dieser Zeitfaktor besitzt bei Reservoir- bzw. Okklusiv-Verbänden Bedeutung und steigert normalerweise die Absorption, sofern nicht überlagernde Einflüsse wie z.B. mikrobielle Zersetzung im Reservoir zum Tragen kommen.

IV.2.d. Häufigkeit der Applikation

Das Für und Wider mehrmaliger (mehrzeitiger) Applikation eines Externums kann nur im konkreten Einzelfall erörtert werden, da die bislang vorliegenden experimentellen Ergebnisse keine allgemeinen Schlußfolgerungen zulassen.
Die drei nachstehend geschilderten Situationen sind als Beispiele für grundsätzliche Überlegungen zur Applikationshäufigkeit zu verstehen:

- Eine Substanz, die schnell permeiert sowie schnell resorbiert und eliminiert wird, erfordert u.U. häufige Applikationen, um wirksame lokale (oder systemische) Konzentrationen zu gewährleisten.
- Bei einer Substanz, die zwar schnell permeiert, aber langsam eliminiert wird, ist von häufigen Applikationen Abstand zu nehmen, um kumulative toxische Einflüsse zu vermeiden.
- Bei pathologischem Versagen der kutanen Reservoir-Funktion kann aus therapeutischen Gründen eine mehrmalige Applikation pro Tag sinnvoll sein, sofern toxische Einflüsse durch die absorbierte Menge ausgeschlossen werden können.

(EAGLSTEIN, FARZAD & CAPLAND [030] ; WESTER, NOONAN & MAIBACH [096])

IV.3. Absorptionsverbessernde Substanzen

Die klassische Substanz, die die perkutane Aufnahme vieler Stoffe fördert, ist das **Dimethylsulfoxid (DMSO).**

Der Begriff >absorptionsverbessernde Substanz< (Synonym: Akzelerant) ist insofern irreführend, als ein aktiver Prozeß suggeriert wird, der aber nicht vorliegt. DMSO besitzt **keine** Carrier-Funktion.

Es existieren vielfältige Untersuchungen zur Wirkungsweise des DMSO. Zwei wesentliche Effekte bestehen

(1) in der Destruktion molekularer Strukturen im Bereich der Epidermis

(ELFBAUM & LADEN [031,032]; MONTES, DAY & WAND [066] ; SCHEUPLEIN & ROSS [084])

und

(2) in der Substitution epidermal gebundenen Wassers, wobei die Verdrängung des DMSO aus seinen eingenommenen Plätzen durch penetrierende und permeierende Stoffe leichter möglich ist als die Verdrängung des physiologischerweise gebundenen Wassers.

(SCHEUPLEIN & BRONAUGH [123])

Für weitere Ausführungen zum Dimethylsulfoxid wird auf die Übersichtsarbeit von DAVID [021] verwiesen.

Dem DMSO strukturell verwandte Substanzen sind das **Dimethylacetamid (DMAC)** und das **Dimethylformamid (DMFA).** Ihre Effekte auf die perkutane Stoffaufnahme sind aber schwächer als die des DMSO.

Grundsätzlich ist bei diesen Substanzen aus therapeutischer Sicht Vorsicht geboten, da ihre Anwendung unschwer in den Bereich toxischer Effekte (vgl. Seite 55) führen kann.

*

DURCHFÜHRUNG UND ERGEBNISSE DER ABSORPTIONS- UND ELIMINATIONSSTUDIEN MIT HIRUDIN BEI TIER UND MENSCH

VORBEMERKUNG 60

A. RENALE HIRUDIN-ELIMINATION NACH TOPISCHER APPLIKATION BEIM SCHWEIN 61

I. VERSUCHZIEL 61

II. EXPERIMENTELLE DURCHFÜHRUNG 61

1. Versuchstier 61

2. Verwendetes Applikat 61

3. Versuchsgestaltung 61

4. Nachweismethode 61

III. ERGEBNISSE 62

1. Meßwerte 62

2. Auswertung 62

3. Zusammenfassung und Schlußfolgerung 63

IV. DISKUSSION DER ERGEBNISSE 64

1. Anlaufzeit ("lag-time") der renalen Elimination . . . 64

2. Dauer der Elimination 64

3. Pharmakon-Reservoir 64

B. HIRUDIN-NACHWEIS IN HAUTGEWEBSPROBEN NACH TOPISCHER APPLIKATION BEIM SCHWEIN 65

I. ZIELSETZUNG DES VERSUCHS 65

II. EXPERIMENTELLE DURCHFÜHRUNG 66

1. Versuchstier 66

2. Verwendetes Applikat 66

3. Versuchsgestaltung 66

4. Nachweismethode 68

III. ERGEBNISSE 69

Meßwerte und Auswertung 69

1. Bestimmung der Hirudin-Gewebekonzentration in den Proben . 69

2. Einfluß der Hautreinigung und der Art der Probe . . . 70

IV. DISKUSSION DER ERGEBNISSE UND SCHLUSSFOLGERUNGEN . 71

Vorbemerkung 71

1. Bedeutung der postapplikatorischen Hautoberflächen-Reinigung . 71

2. Bedeutung der Probentrennung in Teilproben . . . 72

3. Vorteil der subkutanen Probenentnahme 73

C. RENALE ELIMINATION VON HIRUDIN NACH INTRAVENÖSER APPLIKATION BEIM PAVIAN 74

I. ZIEL UND NOTWENDIGKEIT DER PRIMATEN-VERSUCHE . . 74

1. Bestimmung des transkorporalen Verlustes für Hirudin . . 74

2. Ermittlung der Ausscheidungskinetik 74

3. Untersuchung der intravenösen Verträglichkeit . . . 74

II. EXPERIMENTELLE DURCHFÜHRUNG 76

1. Versuchstiere 76

2. Versuchsgestaltung 76

3. Verwendetes Applikat 77

4. Probenmaterialien 78

a. Spontan-Urin 78
b. Katheter-Urin 78
c. Venöses Blut 78

5. Nachweismethoden 78

a. Radioimmunobioassay (RIBA) 78
b. Gerinnungslabor 78

III. ERGEBNISSE 79

1. Tierbeobachtung 79

a. Versuchsbegleitende Verhaltenskontrolle 79
b. Postexperimentelle Beobachtungsphase 79

2. Meßwerte 79

a. Hirudin-Elimination 79
b. Veränderungen im Gerinnungstatus 79

3. Auswertung 79

a. Individuelles Eliminationsverhalten 79
b. Applizierte Dosis und renale Elimination 82
c. Beeinflussung der Blutgerinnung 83
d. Applizierte Dosis und Diurese 86

IV. DISKUSSION DER ERGEBNISSE 88

1. Renale Eliminationskinetik 88

2. Applizierte Dosis und prozentuale Elimination . . . 89

3. Applizierte Dosis und Diurese 89

4. Sensibilisierung 89

5. Veränderungen in der Blutgerinnung 90

a. Plasmatische Parameter 90
b. Korpuskuläre Parameter 90

6. Systemische Verträglichkeit 91

D. RENALE HIRUDIN-ELIMINATION NACH TOPISCHER APPLIKATION BEIM MENSCHEN 92

I. SPONTANE PERKUTANE ABSORPTION 92

1. Versuchsziel 92

2. Experimentelle Durchführung 92

a. Probanden 92
b. Verwendetes Applikat 92
c. Versuchsgestaltung 93
d. Nachweismethoden 94

3. Ergebnisse 95

a. Begutachtung der bestrichenen Haut 95
b. Meßwerte 95
c. Auswertung 97

4. Diskussion und Beurteilung der Ergebnisse 98

a. Permeationsparameter 98
b. Eliminationskinetik 99
c. Mehrfachapplikation 99
d. Blutgerinnung 99

II. PERKUTANE ABSORPTION IM ELEKTRISCHEN FELD . . . 100

1. Versuchsziel 100

2. Experimentelle Durchführung 100

a. Proband 100
b. Verwendetes Applikat 100
c. Versuchsgestaltung 100
d. Nachweismethode 101

3. Ergebnisse 102

a. Verlaufsbeobachtung 102
b. Meßwerte 102
c. Auswertung 103

4. Diskussion und Beurteilung der Ergebnisse 104

a. Stromfreie Phase 104
b. Einwirkung des Gleichstromfeldes 104

E. HIRUDIN-NACHWEIS IN HAUTGEWEBSPROBEN NACH TOPISCHER APPLIKATION BEIM MENSCHEN 107

VERSUCHSZIEL 107

I. VORVERSUCH 107

1. Experimentelle Durchführung 107

a. Proband 107
b. Versuchsgestaltung 107
c. Verwendetes Applikat 108
d. Nachweismethode 108

2. Ergebnisse 109

a. Probenadaptierte Standardkurve 109
b. Meßwerte und Auswertung 110

3. Diskussion und Beurteilung der Ergebnisse 112

4. Zusammenfassende Beurteilung 112

E.II. KLEINSERIE MIT FALLZAHL N = 4 113

1. Experimentelle Durchführung 113

a. Probanden 113
b. Versuchsgestaltung 113
c. Verwendetes Applikat 114
d. Nachweismethode 114

2. Ergebnisse 115

a. Probenadaptierte Standardkurve 115
b. Meßwerte und Auswertung 116

3. Diskussion und Beurteilung der Ergebnisse 117

4. Zusammenfassende Beurteilung 118

III. ERWEITERTE STUDIE MIT FALLZAHL N = 19 . . . 119

1. Experimentelle Durchführung 119

a. Probanden 119
b. Versuchsgestaltung 119
c. Verwendetes Applikat 119
d. Nachweismethode 119

2. Ergebnisse 120

a. Probenadaptierte Standardkurve 120
b. Prämissen der Auswertung 121
c. Meßwerte und Auswertung 122

3. Diskussion und Beurteilung der Ergebnisse 125

a. Hirudinkonzentration der Salbe 125
b. Einwirkzeit der Salbe 125
c. Kritische Betrachtung der Auswertung 126

4. Zusammenfassende Beurteilung 126

*

ZUSAMMENFASSUNG DER GESAMTEN ARBEIT . . . 127

*

VORBEMERKUNG

Unter Beachtung der im ZWEITEN TEIL dargestellten Grundlagen zur perkutanen Absorption sollten mit Hilfe der im ERSTEN TEIL erläuterten Meßmethode des Radioimmunobioassay (RIBA) eigene Untersuchungen zur perkutanen Aufnahme von Hirudin durchgeführt werden.

Der Nachweis der Aufnahme topisch applizierter Stoffe durch die Haut kann - ungeachtet weiterer Möglichkeiten - grundsätzlich auf folgenden Wegen erfolgen:

- Nachweis der Substanz (oder für die Substanz charakteristischer Metabolite) in Ausscheidungsprodukten wie Urin, Faeces oder Sekreten.
- Nachweis der Substanz in tieferen Hautschichten und/oder darunterliegenden Geweben respektive in Organen.
- Nachweis der Substanz im Blut.

Die erste Möglichkeit stellt den experimentell einfachsten Weg dar; sie weist jedoch als Nachteil die Unwägbarkeiten der transcorporalen Passage (Metabolismus, Organspeicherung, Wechselwirkungen etc.) auf.

Die zweite Möglichkeit gestaltet sich experimentell in der Regel schwieriger, bietet dafür jedoch den Vorteil genauerer Aussagen über den perkutanen Stofftransport.

Beide Möglichkeiten kamen in den vorliegenden Untersuchungen mehrfach zur Anwendung.

Auf **die dritte Möglichkeit** wurde ausschließlich bei den humanen i.v.-Versuchen zurückgegriffen (BICHLER, GEMMERLI; bisher unveröffentlichte Ergebnisse).

Bei der Verwendung von Tiermodellen für Absorptions- und Eliminationsversuche zeigen sich oft deutliche Unterschiede zwischen den Spezies und insbesondere zum Menschen; am besten korrelieren hier die Daten von Schwein (junge Hausschweine) und Affe (Paviane) mit denen des Menschen, sodaß diese Spezies die sinnvollsten Tiermodelle für derartige Studien darstellen (nach PFEIFER, PFLEGEL & BORCHERT [118]). Sie wurden dementsprechend auch in den durchgeführten Experimenten eingesetzt.

A. RENALE HIRUDIN-ELIMINATION NACH TOPISCHER APPLIKATION BEIM SCHWEIN

I. VERSUCHSZIEL

Ziel des nachfolgend geschilderten Versuches war es, den Nachweis der perkutanen Aufnahme von Hirudin am Tiermodell in vivo zu führen. Darüberhinaus sollten - geeignete quantitative Versuchsdaten vorausgesetzt - die Meßparameter zur perkutanen Permeation (nach PRATZEL) Anwendung finden, um Vergleiche mit anderen Versuchen zu ermöglichen.

II. EXPERIMENTELLE DURCHFÜHRUNG

II.1. Versuchstier

Im Versuch stand ein weibliches Hausschwein (Rasse: Deutsches Landschwein), etwa 3 Monate alt und 19 kg schwer.

(Versuchstier Nr. 241 des Instituts für Medizinische Balneologie und Klimatologie der Universität München, Marchioninistraße 17, 8000 München 70)

II.2. Verwendetes Applikat

Topisch appliziert wurde Hirudin-Rohextrakt-Salbe der Firma PLANTORGAN in einer Sonderzubereitung vom 09.02.83 mit einer spezifischen Aktivität von **50000 ATE/°g Salbe** entsprechend einem Hirudingehalt von **2,5 mg Hirudin/°g Salbe.**

II.3. Versuchsgestaltung

Zu Beginn des Versuches wurde mit der Kombination von 8 ml HYPNODIL + 2 ml STRESNIL (i.p.) die **Narkose** eingeleitet; die Fortführung der Narkose über die gesamte Versuchsdauer erfolgte über einen i.v.-Zugang am Ohr mit NEMBUTAL in einer Dosierung von ca. 1 ml/h.

Für die Dauer des Versuches befand sich das Tier in aufrechter Lage in einer Bauchhängematte mit frei zugänglichem Rücken, der zu Beginn mit einer elektrischen Schermaschine schonend geschoren wurde.

5 °g der Hirudin-Rohextrakt-Salbe wurden ohne weitere Vorbehandlung mit behandschuhtem Finger leicht massierend unter möglichst gleichmäßiger Verteilung auf eine Rückenfläche von 20 cm x 30 cm = 600 cm^2 aufgetragen.

Die **Uringewinnung** erfolgte über den zu Versuchsbeginn gelegten Blasenkatheter in annähernd halbstündigen Abständen. Eine quantitativ verwertbare Urin-Nullportion (Urinportion vor Hirudin-Applikation) konnte trotz Katheterisierung nicht gewonnen werden.

Die **Versuchsdauer** erstreckte sich über 6 Stunden.

II.4. Nachweismethode

Die gewonnenen Urinportionen wurden der Hirudin-Bestimmung mittels Radioimmunobioassay (RIBA) unterzogen.
(Siehe ERSTER TEIL, Abschnitt C.II.2.a und b, Seite 13 und 14)

III. ERGEBNISSE

III.1. Meßwerte

Tab. 1: Renale Hirudin-Elimination beim Schwein nach topischer Applikation von Hirudin-Rohextrakt-Salbe

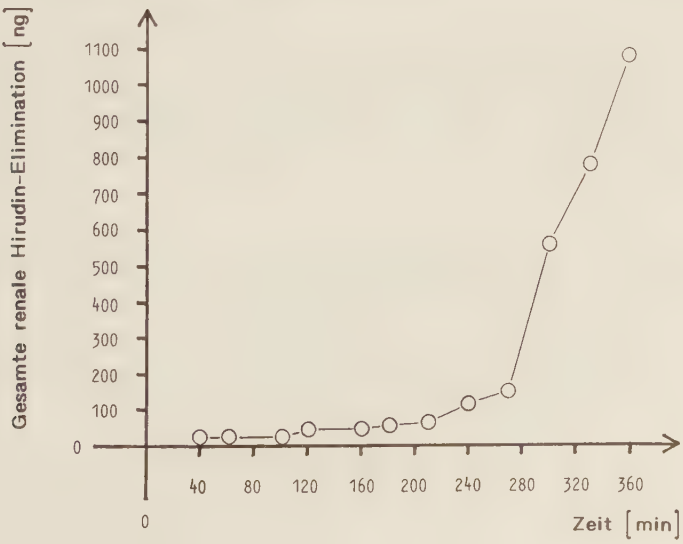
Urinportion	Zeitpunkt* der Gewinnung	Hirudingehalt der Urinportion	Volumen der Urinportion	Hirudinmenge pro Urinportion	Gesamte Hirudinausscheidung
Nr.	[min]	[ng/ml]	[ml]	[ng]	[ng]
1	40	1,5	15,5	23,3	23,3
2	60	0,8	5,5	4,4	27,7
3	100	∅	∅	∅	27,7
4	120	1,0	10,0	10,0	37,7
5	160	0,7	9,2	6,4	44,1
6	180	1,1	4,7	5,2	49,3
7	210	1,0	5,5	5,5	54,8
8	240	7,3	7,7	56,2	111,0
9	270	9,2	3,2	29,4	140,4
10	300	25,0	16,6	415,0	555,4
11	330	26,5	8,6	227,9	783,3
12	360	48,0	6,2	297,6	1080,9

* Nullpunkt der Zeitmessung ist der Beginn der Salbenapplikation
∅ Keine Urinportion gewinnbar

III.2. Auswertung

Graphische Auswertung

Abb. 20: Kumulative renale Hirudin-Elimination (in ng) beim Schwein nach topischer Applikation von Hirudin-Rohextrakt-Salbe



Rechnerische Auswertung

Kumulative Eliminations-Parameter

Unter Verwendung der Tab. 1 (Seite 62) und der im ZWEITEN TEIL, Abschnitt C.II (Seite 42 ff) definierten Parameter ergeben sich folgende Werte:

$$\text{EP (nach T = 360 min)} = \frac{m_{elim.}}{A} = \frac{1080{,}9}{600}\left[\frac{ng}{cm^2}\right] = 1{,}8 \cdot 10^{-5}\left[\frac{g}{m^2}\right]$$

$$\text{SEP (nach T = 360 min)} = \frac{\text{EP (T = 360 min)}}{c} = 7{,}2 \cdot 10^{-3}\left[\frac{°g}{m^2}\right]$$

Eliminations-Raten

Nach PRATZEL sind die Größen ERP und SERP (vgl. Seite 44 ff) im Bereich der konstanten Elimination zu bestimmen. Dies geschieht am besten durch lineare Regressionsrechnung.
(Man könnte auch entsprechend der Formel-Definition Intervall-Raten bilden und mitteln; dieses Verfahren ist aber methodisch umständlicher als die Regressionsrechnung.)
Im Falle des vorliegenden Versuches wurden hierfür die Meßwerte der 270. bis 360. Minute herangezogen. Es ergeben sich damit folgende Werte:

$$\text{ERP (innerhalb t = 90 min)} = 1{,}0 \cdot 10^{-5}\left[\frac{g}{m^2 \cdot h}\right]$$

$$\text{SERP (innerhalb t = 90 min)} = \frac{\text{ERP (t = 90 min)}}{c} = 0{,}4 \cdot 10^{-2}\left[\frac{°g}{m^2 \cdot h}\right]$$

Die Intervallzeit t = 90 min ergibt sich aus dem für die Regressionsrechnung herangezogenen Zeitabschnitt der weitgehend konstanten Elimination (Linearität mit Korrelationsfaktor 0,993 bei einem Signifikanzniveau von 0,007) von der 270. bis zur 360. Minute

III.3. Zusammenfassung und Schlußfolgerung

Bei topischer Applikation von 5 °g Hirudin-Rohextrakt-Salbe einer spezifischen Aktivität von 50000 ATE/°g Salbe (≙ 2,5 mg Hirudin/°g Salbe) auf die geschorene Schweine-Rückenhaut (Fläche: 600 cm²) erfolgt über den Versuchszeitraum von 6 Stunden eine mit dem RIBA signifikant meßbare Ausscheidung von Hirudin (im Nano- bis Mikrogramm-Bereich) im Urin.

Diese Ausscheidung ist eine Folge perkutaner Absorption, da durch Narkose und entsprechende Lagerung des Tieres eine perorale Hirudin-Aufnahme während des Versuchs ausgeschlossen wurde.

Die oben bestimmten Parameter zur Elimination nach perkutaner Permeation lauten in mengenadäquater Benennung:

EP	SEP	ERP	SERP
$1{,}8\left[\frac{ng}{cm^2}\right]$	$0{,}72\left[\frac{°\mu g}{cm^2}\right]$	$1{,}0\left[\frac{ng}{cm^2 \cdot h}\right]$	$0{,}40\left[\frac{°\mu g}{cm^2 \cdot h}\right]$

IV. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

IV.1. Anlaufzeit ("lag-time") der renalen Elimination

Definition:

Unter der **Anlaufzeit t_o** ("lag-time", Verzögerungszeit) ist diejenige Zeitspanne zu verstehen, die nach perkutaner, subkutaner, intravenöser oder sonstiger Applikation eines Stoffes verstreicht, bis eine konstante Ausscheidung im Urin nachweisbar ist.

Beim Schwein beträgt diese Anlaufzeit für Hirudin nach subkutaner Injektion zwischen 20 und 120 Minuten (PRATZEL et al. [077]).

Aufgrund der eigenen Untersuchungen (vgl. Abb. 20, Seite 62) läßt sich beim Schwein nach epikutaner Applikation eine Anlaufzeit für Hirudin von etwa 270 Minuten angeben.

Die Einstellung eines konstanten Fließgleichgewichtes zwischen Substanz-Anflutung (z.B. durch perkutanen Durchtritt aus einem epikutan aufgetragenen Depot) und renaler Elimination ist nur gewährleistet, wenn das Depot in der Menge nicht limitierend ist und die Körperkompartimente gesättigt sind (vgl. Seite 36/37 und Seite 41).

Aufgrund des Eliminationsverlaufs in der Anlaufzeit t_o (siehe Abb. 20, Seite 62) läßt sich diese in zwei Phasen unterteilen:

Frühe t_o-Phase: (0 - 210 min) Hier zeigt sich eine nur sehr geringfügige renale Ausscheidung (im Vergleich zur späteren Elimination).

Späte t_o-Phase: (210-270 min) Hier steigt die Ausscheidung deutlich an und geht schließlich über in die Phase der konstanten Elimination.

Dieses biphasische Verhalten läßt sich erklären mit einer anfänglichen (quantitativ geringen) Shunt-Permeation via Hautanhangsgebilde (bei gleichzeitiger Sättigung der Körperkompartimente), die allmählich überlagert wird vom quantitativ bedeutenderen transepidermalen Stofftransport (vgl. hierzu ZWEITER TEIL, Abschnitt B.III, Seite 39).

IV.2. Dauer der Elimination

Die Ausscheidungskinetik (Abb. 20, Seite 62) legt nahe, daß der Eliminations-Vorgang innerhalb des beobachteten Zeitraumes von sechs Stunden **n i c h t** beendet ist.
Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der Studie von PRATZEL, SEEMÜLLER, DODT & GEMMERLI [077]. Dort wird - wenn auch nach längerdauernder Einwirkzeit der applizierten Salbe - von meßbaren Ausscheidungen über Tage berichtet.

IV.3. Pharmakon-Reservoir

Das Pharmakon-Reservoir von 5 °g Hirudin-Rohextrakt-Salbe lag während des ganzen Versuchszeitraumes auf dem Applikationsareal auf (offen; kein Okklusiv-Verband), sodaß die Pharmakon-Einwirkzeit identisch mit der Kumulationszeit T = 360 min der Elimination ist.

Da die Elimination im Versuchszeitraum keinen Abfall zeigt, kann von einem ausreichenden (nicht erschöpften) Pharmakon-Reservoir ausgegangen werden (vgl. ZWEITER TEIL, Abschnitt C.II, Seite 41).

*

B. HIRUDIN-NACHWEIS IN HAUTGEWEBSPROBEN NACH TOPISCHER APPLIKATION BEIM SCHWEIN

I. ZIELSETZUNG DES VERSUCHS

Nachdem im Abschnitt A (Seite 61 bis 64) die perkutane Absorption von Hirudin aus Hirudin-Rohextrakt-Salbe für die Schweinehaut durch Eliminationsmessung nachgewiesen werden konnte, sollten in einem weiteren Experiment die Möglichkeiten und Probleme des direkten Hirudin-Nachweises in Haut- und Unterhautgewebe studiert werden, um eine geeignete Methodik für eine klinische Studie am Menschen zu entwickeln.

Im einzelnen sollten folgende Fragestellungen beantwortet werden:

(1) Verwendbarkeit einer Vollprobe (Kutis + Subkutis) nach Hautoberflächenbehandlung mit chirurgischerseits üblichen Reinigungssubstanzen

Belädt man ein Hautareal mit Hirudin-Rohextrakt-Salbe und entnimmt man mittels Stanze eine zylinderförmige Probe, die sowohl die Kutis als auch Anteile der Subkutis enthält (sog. Vollprobe), so wird man, erfolgt die Entnahme kurzfristig nach der Applikation, höchstens eine sehr geringe Menge echt permeierten Hirudins nachweisen können, während der Hauptanteil auf nicht-permeiertes Hirudin entfällt, das dem Stratum corneum als Pharmakon-Reservoir anhaftet bzw. aufliegt. Man erhielte somit ein falsch-positives Ergebnis.
Durch die Versuchsreihe sollte geklärt werden, ob durch die präoperativ üblicherweise durchgeführten Reinigungsmaßnahmen eine Entfernung des epikorneal aufliegenden Pharmakon-Reservoirs möglich ist.

(2) Effekt der Probentrennung

Um den unter (1) beschriebenen falsch-positiven Hirudin-Nachweis zu vermeiden, wurde - neben den Reinigungsmaßnahmen für die Hautoberfläche - in einem weiteren Versuchsabschnitt untersucht, inwieweit eine Trennung der Vollprobe nach Entnahme und die anschliessende getrennte Analyse ein differenzierteres Bild zu vermitteln vermögen.
Dazu wurden Vollproben gemäß Abb. 21 (Seite 67) in Teilproben mit Epidermis (wenig Korium/Subkutis) und in Teilproben ohne Epidermis (ausschließlich Korium und Subkutis) getrennt.

(3) Möglichkeit der Hirudin-Verschleppung bei der Probenentnahme durch den zentripedalen transkornealen Stanzvorgang

Bei den Versuchen zu (1) und (2) wurden die Gewebsproben mit einer Stanze von 4 mm Durchmesser unter Durchstoßung der Epidermis entnommen.
Bei diesem Vorgehen könnte oberflächlich epikorneal anhaftendes Hirudin durch den Stanzvorgang in tiefere Schichten verschleppt werden.
Um Meßwerte unter Ausschluß dieser Möglichkeit zu erhalten, wurde nach Auftragen des Hirudin-Rohextraktes ein Applikationsareal relativ weit entfernt von der Entnahmestelle tief subkutan exzidiert. Danach erfolgte unter strikter Vermeidung jeglicher Kontamination die subkutan-zentrifugale Entnahme von Gewebsstanzen (Subkutis + Korium) unterhalb des Applikationsareals unter Wahrung der Unversehrtheit der Hautoberfläche.
Das Pharmakon-Reservoir wurde in diesem Fall **nicht** von der Hautoberfläche entfernt, sodaß die Pharmakon-Einwirkzeit vom Applikationsbeginn bis zur Probenentnahme anzusetzen ist.

II. EXPERIMENTELLE DURCHFÜHRUNG

II.1. Versuchstier

Im Versuch stand ein weibliches Hausschwein (Rasse: Deutsches Landschwein), 4 Monate alt und 20 kg schwer.

(Versuchstier Nr. 239 des Instituts für Medizinische Balneologie und Klimatologie der Universität München, Marchioninistraße 17, 8000 München 70)

II.2. Verwendetes Applikat

Topisch appliziert wurden die in Tab. 3 genannten Mengen an Hirudin-Rohextrakt-Salbe der spezifischen Aktivität von **50000 ATE/°g Salbe** entsprechend **2,5 mg Hirudin/°g Salbe** in einer Sonderzubereitung der Charge HE 102 der Firma PLANTORGAN.

II.3. Versuchsgestaltung

Wie beim Versuch in Abschnitt A befand sich das Tier für die Dauer des Experimentes in aufrechter Lage in einer Bauchhängematte mit frei zugänglichem Rücken, der vor der Salbenanwendung mit einer elektrischen Schermaschine geschoren wurde.

Während des Versuches stand das Tier unter Narkose (siehe Seite 61); nach Abschluß der Gewebsproben-Entnahmen wurde aufgrund der gesetzten kutanen Substanzläsionen und zur Möglichkeit der Organanalyse im Rahmen einer anderen Versuchsreihe der Exitus pharmakologisch herbeigeführt.

Auftrag der Hirudin-Rohextrakt-Salbe

Zur Quantifizierung des Auftrags wurden auf der geschorenen Rückenhaut des Schweines 6 Felder (mit A bis F bezeichnet) von je 2,5 cm x 7,5 cm = 18,75 cm² aufgezeichnet, auf die definierte Mengen an Hirudin-Rohextrakt-Salbe mittels eines Spatels leicht massierend gleichmäßig verteilt wurden.
Die Ergebnisse der mittels Differenzwägung durchgeführten Mengenbestimmung sind in Tab. 3 zusammengefaßt.

Tab. 3: **Beladung der Schweine-Rückenhaut mit Hirudin-Rohextrakt-Salbe bei der Untersuchung der Bedeutung postapplikatorischer Hautreinigungsmaßnahmen**

FELD	Salben-Auftrag	Flächenbeladung an			Anteilige Beladung der Stanzzylinderfläche an		
		Salbe	Aktivität	Hirudin	Salbe	Aktivität	Hirudin
Nr.	[mg]	[°g/m²]	[ATE/m²]	[g/m²]	[°g]	[ATE]	[g]
	---	----	x 10^{+6}	x 10^{-3}	x 10^{-4}	----	x 10^{-8}
A	59	31,5	1,58	0,79	3,97	20	1,0
B	96	51,2	2,56	1,28	6,45	32	1,6
C	107	57,1	2,86	1,43	7,19	36	1,8
D	90	48,0	2,40	1,20	6,05	30	1,5
E	99	52,8	2,64	1,32	6,65	33	1,7
F	67	35,7	1,79	0,89	4,50	23	1,1

Reinigende Hautoberflächenbehandlung

Die sechs Felder A bis F erfuhren **nach** dem Auftragen der Salbe und **vor** der Gewebsprobenentnahme unterschiedliche Behandlungen:

Feld A: Keine Maßnahme

Feld B: Einmaliges Abwischen der aufgetragenen Salbe mit einem trockenen KLEENEX-Papiertuch

Feld C: Reinigung der Hautoberfläche mittels Tupfer und FREKA-Seifenlösung

Feld D: Wie bei Feld C, zusätzlich Reinigung mit Äther

Feld E: Wie bei Feld D, zusätzlich Reinigung mit KODAN-Lösung

Feld F: Keine Maßnahme

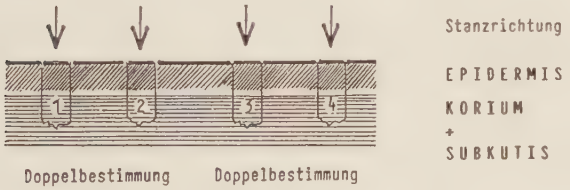
Gewebsgewinnung

Zur Gewebsgewinnung dienten Einmal-Rundstanzen (Stanzteil aus angeschliffenem Metall) eines lichten Durchmessers von 4 mm. An weiteren Instrumenten wurden Einmalpinzetten aus Plastik und jeweils frisch sterilisierte Scheren verwendet.
Der statistischen Sicherung der Meßwertaussage galt die Entnahme von jeweils 2 (beim Feld F: 4) Proben identischer Lokalisation pro Bestimmungskriterium.

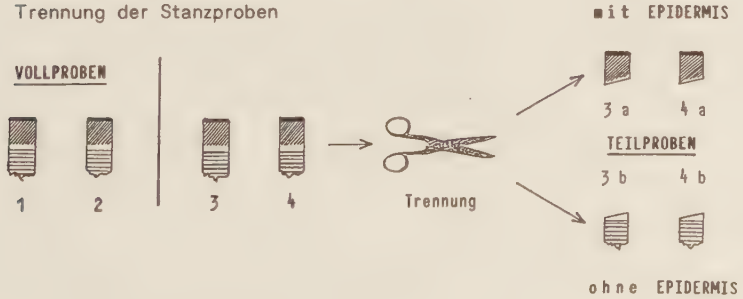
Unmittelbar nach der Probengewinnung bzw. nach der Trennung in die Teilproben wurden die in EPPENDORF-Tubes befindlichen Gewebspartikel in flüssigem Stickstoff schockgefroren und danach bis zur Aufarbeitung und Testung im RIBA für einen Zeitraum von wenigen Tagen bei -75°C tiefgefroren gelagert.

Abb. 21: Probengewinnung in den Fällen der Felder A bis E

a: Querschnitt



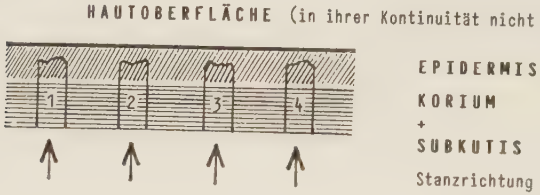
b: Trennung der Stanzproben



Gewebsgewinnung

Abb. 22: Probengewinnung im Falle des Feldes F

Querschnitt



Vierfachbestimmung

Zeitliche Abfolge

Die Experimente wurden in alphabetischer Reihenfolge von Feld A bis F durchgeführt, wobei jedes Feld komplett vom Salben-Auftrag bis zur Probenentnahme behandelt wurde, bevor der Übergang zum nächsten Areal erfolgte.

Für die einzelnen Maßnahmen sind folgende Arbeitszeiten anzusetzen:

Salben-Auftrag:		1 min
Reinigende Oberflächenbehandlung	mit einer Substanz:	1 min
" "	mit zwei Substanzen:	2 min
" "	mit drei Substanzen:	3 min
Gewinnung einer Gewebsstanze:		1 min
Teilung einer Gewebstanze:		1 min

Die zeitliche Abfolge besitzt Bedeutung für die Diskussion der perkutanen Permeation im unmittelbaren Anschluß an die Salben-Applikation **vor** Probengewinnung (vgl. Abschnitt B.IV.3, Seite 73).

II.4. Nachweismethode

Die gewonnenen Gewebspartikel wurden der Hirudin-Bestimmung mittels Radioimmunobioassay unterzogen (vgl. ERSTER TEIL, Abschnitt C.II.3, Seite 17 ff).

Als davon abweichende besondere Maßnahme ist die Herstellung von Verdünnungsproben (mit STD-Puffer) zu nennen, die aus den Lyophilisaten der Extrakte solcher Gewebsproben angefertigt wurden, die einen so hohen Gehalt an Hirudin erwarten ließen, daß sie ohne Verdünnung außerhalb des RIBA-Meßbereiches gelegen hätten.

III. ERGEBNISSE

Meßwerte und Auswertung:

III.1. Bestimmung der Hirudin-Gewebekonzentration in den Proben

Tab. 4: Hirudingehalt von Hautgewebsproben des Schweines bei unterschiedlichen Maßnahmen der postapplikatorischen Oberflächenreinigung und bei variierender Art der Probengewinnung

FELD	Probe	Gewicht der Probe	Hirudinmenge in der Probe	Gewebekonzentration	Mittelwert der Doppelbestimmung: Hirudinmenge in der Probe	Mittelwert der Doppelbestimmung: Gewebekonzentration
	Nr.	[mg]	[ng]	[ng Hirudin / mg Gewebe]	[ng]	[ng Hirudin / mg Gewebe]
A Keine Maßnahme	1	44	873	19,8	815	18,0
	2	47	756	16,1		
	3 a	12	179	14,9	127	9,4
	4 a	19	74	3,9		
	3 b	25	> 6	> 0,2	> 6	> 0,2
	4 b	25	> 6	> 0,2		
B Nur trockenes Abwischen	1	35	23	0,7	---	-----
	2	42	ø	ø		
	3 a	13	> 6	> 0,5	> 6	> 0,8
	4 a	6	> 6	> 1,0		
	3 b	21	ø	ø	ø	ø
	4 b	28	ø	ø		
C Nur Freka	1	72	> 6	> 0,08	> 6	> 0,095
	2	53	> 6	> 0,11		
	3 a	4	> 6	> 1,5	> 6	> 1,000
	4 a	12	> 6	> 0,5		
	3 b	34	> 6	> 0,18	> 6	> 0,160
	4 b	43	> 6	> 0,14		
D Freka + Äther	1	38	5,8	0,15	6,1	0,140
	2	48	6,3	0,13		
	3 a	9	3,9	0,43	2,3	0,540
	4 a	11	0,7	0,64		
	3 b	33	0,4	0,01	0,8	0,025
	4 b	31	1,1	0,04		
E Freka + Äther + Kodan	1	45	0,14	0,003	0,540	0,017
	2	35	0,94	0,027		
	3 a	8	0,56	0,07	0,068	0,115
	4 a	5	0,80	0,16		
	3 b	27	ø	ø	ø	ø
	4 b	28	ø	ø		
F Keine Maßnahme	1	46	5,8	0,126	Mittelwert der Vierfachbestimmung: 3,1	0,077
	2	36	2,4	0,067		
	3	38	2,0	0,053		
	4	35	2,1	0,060	Subkutanstanzen	

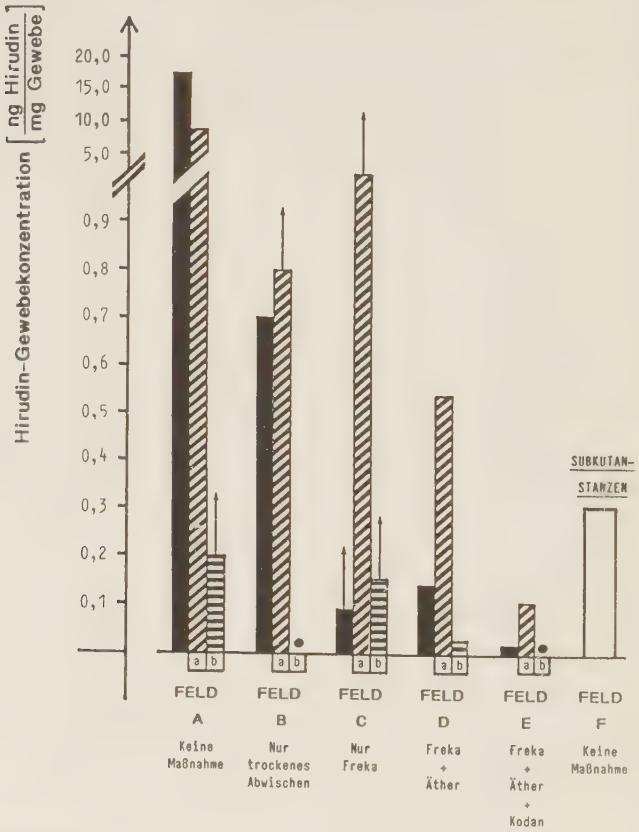
> Der Meßwert liegt im Bereich hoher Hirudinwerte, aber außerhalb des quantifizierbaren Bereiches der Standard-Eichkurve

ø Mit dem RIBA kein Hirudingehalt nachweisbar

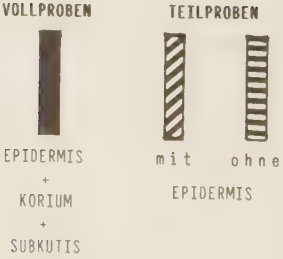
-- Mittelwertbildung nicht sinnvoll

III.2. Einfluß der Hautreinigung und der Art der Probe

Abb. 23: Abhängigkeit der Hirudin-Gewebekonzentration der Hautgewebsproben des Schweines von postapplikatorischen Reinigungsmaßnahmen der Hautoberfläche und von der Art der Probengewinnung



Legende:



↑ Es handelt sich bei den dargestellten Werten um Mindestwerte; die tatsächlichen Werte können höher liegen.

● Im RIBA kein Hirudingehalt nachweisbar.

IV. DISKUSSION DER ERGEBNISSE UND SCHLUSSFOLGERUNGEN

Vorbemerkung

Da nicht für alle Proben Verdünnungsreihen von den Lyophilisaten aus den Gewebsextrakten angesetzt wurden, sondern nur für diejenigen, die theoretisch einen hohen Hirudingehalt erwarten ließen, entzogen sich einige Proben der exakten quantitativen Hirudin-Bestimmung; semi-quantitative sowie qualitative Aussagen sind dessen ungeachtet aber auch in diesen Fällen möglich.

IV.1. Bedeutung der postapplikatorischen Hautoberflächen-Reinigung

Sowohl die Ergebnisse der Vollproben als auch die der Teilproben zeigen, daß die Gewebekonzentration an Hirudin umso geringer ist, je intensiver die postapplikatorische Reinigungsprozedur durchgeführt wird (Tab. 4, Seite 69 und Abb. 23, Seite 70).

Dies ist einleuchtend, wenn man die makroskopisch evidente Entfernung des Salben-Reservoirs von der Hautoberfläche bei den Feldern B, C, D und E berücksichtigt, während bei Feld A das gesamte der Hautoberfläche aufliegende Depot verfügbar ist, wodurch sich hier eine sehr hohe Hirudinbeladung der epidermishaltigen Proben ergibt.

Doch nicht nur das epikutan aufliegende (makroskopisch erkennbare) Pharmakon-Depot bestimmt den Hirudingehalt epidermishaltiger Proben, auch das Wirkstoff-Reservoir des Stratum corneum geht in die Bestimmung mit ein; hier handelt es sich um Hirudinmengen, die physikalisch und/oder chemisch in der Hornschicht deponiert sind, ohne jedoch tatsächlich perkutan penetriert bzw. permeiert zu sein (vgl. ZWEITER TEIL, Abschnitt A.II.2.b, Seite 37). Dieses Hornschicht-Depot ist natürlich umso geringer, je weniger Wirkstoff epikutan verfügbar ist.

Darüberhinaus beinhalten die in den Proben gemessenen Hirudinmengen auch echt permeiertes Hirudin (vgl. Feld F, Seite 70/73); dessen Anteil am Gesamtgehalt der Proben ist jedoch vergleichsweise gering, zum einen aufgrund der (teilweisen) Entfernung des Pharmakon-Depots (Felder B, C, D und E), und zum anderen wegen der kurzen Einwirkzeit (wenige Minuten) bis zur Probenentnahme (vgl. Seite 68).

Welchen quantitativen Einfluß die Reinigungsprozedur selbst auf die Permeabilität der Haut nimmt (im Sinne der physikalisch-chemischen Alteration; siehe Seite 54 ff), kann anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht geklärt werden.

Fazit: Eine postapplikatorische Reinigung der Hautoberfläche, wie sie chirurgischerseits üblich ist, entfernt zwar das in Salbenform aufgetragene Hirudin zu einem großen Teil, je intensiver die Reinigung durchgeführt wird, Reste eines epidermalen Reservoirs an nicht-penetriertem bzw. nicht-permeiertem Hirudin können aber nicht sicher beseitigt werden.

Die Entnahme von Vollproben oder epidermishaltigen Teilproben mittels Stanze nach Reinigung der Hautoberfläche vom Applikat mit dem Ziel des Permeationsnachweises ist deshalb ein **untaugliches** Verfahren.

IV.2. Bedeutung der Probentrennung in Teilproben

Vergleich: Teilproben m i t Epidermis - Teilproben o h n e Epidermis

Soweit die Meßwerte quantifizierbar sind, zeigt sich, daß Teilproben ohne Epidermis (Korium + Subkutis) wesentlich niedrigere Gewebekonzentrationen an Hirudin aufweisen (b-Säulen der Abb. 23, Seite 70) als die Teilproben mit Epidermis (a-Säulen der genannten Abbildung).

Die Gründe hierfür sind:

- Epidermales (epikutanes und korneales) Reservoir an Hirudin (siehe Abschnitt IV.1, Seite 71).
- Abtransport der geringen Mengen an Hirudin, die in der kurzen Einwirkzeit ins Korium bzw. ins Subkutangewebe permeiert sein können, durch das Gefäßsystem; dadurch entzieht sich diese Menge zum Teil der Analyse.

Vergleich: Teilproben m i t Epidermis - Vollproben

Im Vergleich zu den Vollproben ist die Hirudin-Gewebekonzentration bei den epidermishaltigen Teilproben höher (Felder B, C, D und E; Ausnahme: Feld A; siehe a-Säulen in Abb. 23, Seite 70).

Dies erklärt sich dadurch, daß durch die Probentrennung die Gewebemenge zwar reduziert wird, der Sitz der Hauptmenge an Hirudin bei den epidermishaltigen Teilproben aber erhalten bleibt.
Die umgekehrte Relation im Falle des Feldes A ist wohl darauf zurückzuführen, daß hier durch den Verzicht auf jegliche Reinigungsmaßnahme für die Hautoberfläche eine Hirudin-Permeation größeren Umfanges (als bei den Feldern B bis D) aus dem epikutanen Depot in tiefere Schichten erfolgen konnte. Diese Hirudinmenge, die bei der Messung einer Vollprobe miterfaßt wird, fehlt bei der Analyse einer Teilprobe mit Epidermis (aber wenig Korium + Subkutis). Die vergleichsweise hohe Hirudinkonzentration in den epidermisfreien Teilproben (Korium + Subkutis) stützt diese Erklärung (vgl. Abb. 23, Seite 70 und Abb. 21, Seite 67).

Hirudinverschleppung beim transkornealen Stanzvorgang

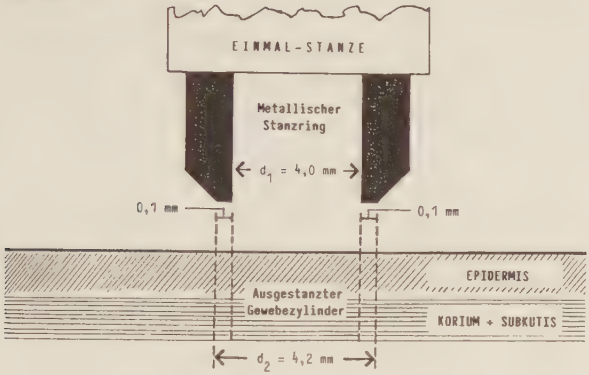
Durch die Probentrennung wird zwar die Erfassung nicht-permeierter epidermaler Hirudin-Depots vermieden, trotzdem sind falsch-positive Resultate möglich, wie folgende Berechnung zeigt:

Wie in Abb. 24 (nächste Seite) dargestellt, gerät die Stanze bei Durchtritt durch das Stratum corneum mindestens mit einer salbenbeladenen Hautfläche in Kontakt, die sich aufgrund der Materialstärke des horizontal auf die Haut auftreffenden Materialanteils der Stanze von 0,1 mm als Fläche eines Kreisringes mit dem lichten Durchmesser d_1 = 4,0 mm und dem Außendurchmesser d_2 = 4,2 mm berechnet:

$$\underline{A_{Ring}} = \frac{\pi}{4} \cdot (d_2 + d_1) \cdot (d_2 - d_1) = \underline{1{,}29 \cdot 10^{-6}\ m^2}$$

Bei einer Hirudin-Flächenbeladung von z.B. $0{,}79 \cdot 10^{-3}$ g/m² im Falle von Feld A (siehe Tab. 3, Seite 66) ist demnach mit einer Hirudin-Verschleppung in die Tiefe von näherungsweise $(0{,}79 \cdot 10^{-3}\ g/m^2) \cdot (1{,}29 \cdot 10^{-6}\ m^2) = 1{,}02 \cdot 10^{-9}$ g ~ 1 ng zu rechnen.

Abb. 24: Hirudin-Verschleppungsmechanismus beim transkornealen Stanzvorgang



Fazit: Die Trennung von Vollproben in epidermishaltige und in epidermisfreie Teilproben gestattet zwar die Ausschaltung eines falsch-positiven Hirudin-Nachweises durch Messung epidermaler Reservoirs; nicht ausgeschlossen sind aber falsch-positive Ergebnisse durch Anwesenheit verschleppten Hirudins aufgrund des Stanzvorganges von der Hautoberfläche aus.

Eine Hautgewebsproben-Entnahme, die auf dem perforierenden Durchtritt durch die Hautoberfläche an der Stelle der Hirudin-Applikation beruht, ist für den exakten Permeationsnachweis **ungeeignet.**

IV.3. Vorteil der subkutanen Probenentnahme

Um die bisher beschriebenen Möglichkeiten des falsch-positiven Hirudin-Nachweises zu vermeiden, wurden im Feld F die Proben bei intakter Hautoberfläche von subkutan entnommen, nachdem das gesamte Feld mit einer in weitem Abstand vom Applikationsareal gelegenen Schnittführung tief subkutan exzidiert worden war. Dadurch konnte eine Hirudinverschleppung und Kontamination der Proben vermieden werden.

Theoretisch müßten diese Proben bei unmittelbar nach Salben-Applikation durchgeführter Gewebsgewinnung negative Resultate im Sinne von Leerwerten liefern.
Da aber bei der **praktisch**en Versuchsdurchführung zwischen Salben-Auftrag und Gewebsgewinnung eine meßbare Zeitspanne verstreicht (siehe Seite 68), ist u.U. doch mit permeierten Hirudinmengen zu rechnen. Tatsächlich konnte in den Proben des Feldes F Hirudin nachgewiesen werden (Tab. 4, Seite 69).

Fazit: Die Gewebsproben-Entnahme von subkutan, wie sie bei Feld F erfolgte, schließt den falsch-positiven Hirudin-Nachweis durch Messung eines epidermalen Reservoiranteils bzw. von verschleppten Hirudinmengen aus.

Bereits Salbeneinwirkzeiten im Minuten-Bereich (2-5 min) führen zu meßbaren Gewebekonzentrationen an Hirudin im Bereich von Korium und Subkutis.

Die Gewebsproben-Entnahme von subkutan nach den Modalitäten des Feldes F stellt somit ein **geeignetes** Verfahren für den Permeationsnachweis dar.

C. RENALE ELIMINATION VON HIRUDIN NACH INTRAVENÖSER APPLIKATION BEIM PAVIAN

I. ZIEL UND NOTWENDIGKEIT DER PRIMATEN-VERSUCHE

I.1. Bestimmung des transkorporalen Verlustes für Hirudin

Durch i.v.-Injektion von Hirudin und anschließende Messung der Ausscheidung im Urin sollte im Tiermodell der Substanzverlust durch die transkorporale Passage studiert werden.

Die Differenz zwischen der verabreichten und der im Harn wiedergefundenen Hirudinmenge ist in den Kompartimenten des Körpers und in alternativen Ausscheidungsformen (Faeces, Sekrete) zu finden (siehe Abb. 25, Seite 75 sowie PRATZEL et al.[077] und BRUCKBAUER [132]).

Die Abb. 25 zeigt, daß die renale Elimination nur **einen** Weg der Substanzentfernung aus dem Organismus darstellt, in vielen Fällen jedoch den quantitativ bedeutendsten.

Mit steigender Versuchsdauer reduziert sich das Defizit der renalen Ausscheidung durch (teilweise) Rückdiffusion aus den Körper-Kompartimenten ins zentrale Kompartiment des Gefäßsystems und nachfolgende Elimination.

So konnte MARKWARDT[113] am Tiermodell des Kaninchens im 24-h-Harn 70-80% der intravenös (und auch der subkutan) injizierten Hirudinmenge wiederfinden; der transkorporale Verlust betrug demnach im beobachteten Versuchszeitraum 20-30%.

Untersuchungsergebnisse über transkorporale Verluste sind von Bedeutung für die Abschätzung des perkutanen Stoffdurchtritts aus den Daten der renalen Elimination nach Permeation (vgl. ZWEITER TEIL, Abschnitt C.II.3, Seite 46).

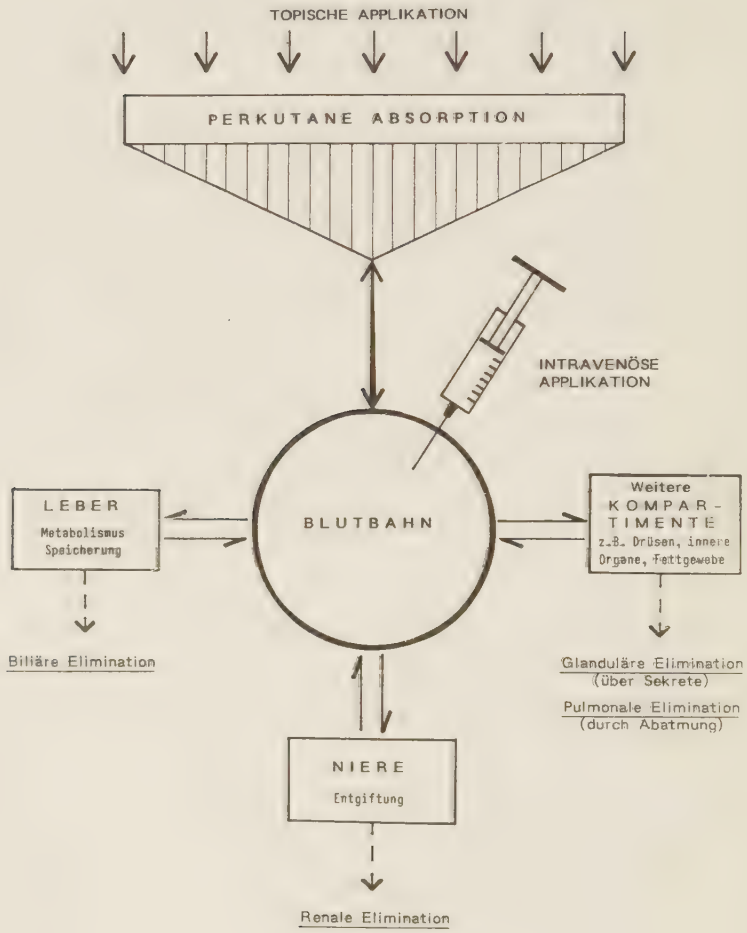
I.2. Ermittlung der Ausscheidungskinetik

Neben der summarisch-quantitativen Erfassung der Hirudin-Elimination galt das Interesse in gleicher Weise dem zeitlichen Verlauf des renalen Ausscheidungsvorganges, insbesondere im Hinblick auf die anzusetzende Versuchsdauer bei den später durchzuführenden Human-Versuchen.

I.3. Untersuchung der intravenösen Verträglichkeit

Darüberhinaus sollte durch die i.v.-Versuche auch die systemische Verträglichkeit für Hirudin geklärt werden.
Als Vorstudie für eine Testung beim Menschen wurde hierzu das Tiermodell des Primaten in Form von Pavianen gewählt.

Abb. 25: Möglichkeiten für transkorporale Pharmakon-Wege



II. EXPERIMENTELLE DURCHFÜHRUNG

II.1. Versuchstiere

Es wurden 15 Einzelversuche mit 13 Tieren durchgeführt, ausnahmslos Paviane, deren Lebensalter 3 bis 6 Jahre betrug, und deren Körpergewicht zwischen 6 und 14 kg lag.

Zum Zeitpunkt des Versuchs war jedes Tier gesundheitlich ohne auffallenden Befund, insbesondere wurde auf die Erfüllung folgender Prämissen geachtet:

- **Keine** erkennbaren Störungen der Ausscheidungsfunktionen (wie z.B. Niereninsuffizienz, gastrointestinale Störungen etc.)
- **Keine** pharmakologischen Anwendungen im Intervall von 14 Tagen vor dem Versuch
- **Keine** bisherigen Versuche mit hirudinhaltigen Substanzen

  Diese letzte Voraussetzung gilt nicht für die Versuche Nr. 13 und Nr. 15 am Tier mit der Tätowierungs-Nr. 3838, bei denen der vorhergehende Kontakt mit Hirudin zur Klärung einer eventuellen Sensibilisierung beabsichtigt war.

II.2. Versuchsgestaltung

Rahmenbedingungen

Da zur Bestimmung der renalen Ausscheidungsmengen an Hirudin die exakte Kenntnis der ausgeschiedenen Urinmengen (ohne Verluste) benötigt wird, zum anderen Verunreinigungen des Urins durch Kot etc. das Nachweisverfahren des RIBA stören, konnten die Versuche nicht im Stoffwechselkäfig durchgeführt werden. Es mußte eine quantitativ und zeitlich kontrollierte Uringewinnung gewährleistet sein, was sowohl für Katheterurin als auch für Spontanurin erreicht wurde.

Nach Isolierung von der Horde wurden die Tiere durch 3 ml KETANEST i.m. narkotisiert, gewogen und in einem Wandsitz fixiert. Der weiteren Sedierung bei Bedarf diente VETRANQUIL; die benötigte Menge lag je nach Körpergewicht bei etwa 1 ml i.m. pro Stunde.

Einer Auskühlung der ruhiggestellten Tiere wirkte die auf 26°C erhöhte Raumtemperatur entgegen.

Versuchsdauer

Die Versuchsdauer erstreckte sich im Schnitt über 6 Stunden.

Die Tiere blieben im kürzesten Fall 14 Tage, ansonsten länger (bis zu 6 Monate) in Obhut des betreuenden Tierpflegers; dieser postexperimentelle Beobachtungszeitraum diente der Erfassung eventueller Spätschäden.

Hirudin-Applikation

Die Applikation der Hirudinlösung (siehe II.3, Seite 77) erfolgte jeweils intravenös über die Vena femoralis, wobei besonders darauf geachtet wurde, durch mehrminütige Kompression post injectionem eine Hämatombildung mit Reflux der Hirudinlösung ins Gewebe und somit eine Verfälschung der intravenös verabreichten Menge zu vermeiden.
In Fällen, in denen eine Hämatombildung trotzdem nicht ausgeschlossen werden konnte, ist dies vermerkt (vgl. Seite 88).

II.3. Verwendetes Applikat

Zur Anwendung gelangte bei jedem der durchgeführten Versuche **steriles, pyrogenfreies Reinsthirudin** (Lyophilisat der Firma PLANTORGAN, Chargen-Nr. HE 3/5 705; aus herstellungstechnischen Gründen mit Mannit versetzt), das zur intravenösen Verabreichung in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen wurde.
Die Menge an appliziertem Hirudin wurde durch Testung eines Aliquots der injizierten Lösung im RIBA bei Kenntnis des verabreichten Volumens kontrolliert.
Es wurden 7 Versuchsgruppen mit steigender Dosierung von 0,05 - 275 µg Hirudin/kg Körpergewicht angesetzt.

Tab. 5: Intravenös applizierte Hirudin-Dosen beim Pavian

(Die Nummerierung bezieht sich auf die chronologische Reihenfolge der Versuche, während die Tabelle nach steigender Dosierung gegliedert ist.)

GRUPPE	VERSUCH	Hirudingehalt der injizierten Lösung	Injiziertes Volumen	Gesamte injizierte Hirudinmenge	Körpergewicht des Tieres	Applizierte Hirudin-Dosis
	Nr.	[µg/100 µl]	[ml]	[µg]	[kg]	[µg/kg]
A	2	0,096	0,6	0,576	12,0	0,048
	10	0,054	1,4	0,756	14,0	0,054
	11	0,063	1,3	0,819	13,0	0,063
B	8	0,246	0,9	2,214	8,8	0,252
	9	0,246	0,8	1,968	7,6	0,259
C	1*	0,747	0,6	4,482	12,0	0,374
	7	0,533	0,9	4,797	8,5	0,564
	6	0,533	0,8	4,264	7,4	0,576
D	4	1,139	1,2	13,668	11,7	1,168
	5	1,139	0,8	9,112	7,5	1,215
	3	1,242	0,8	9,936	8,0	1,242
E	14	36,960	1,3	480,480	12,3	39,063
F	13*	61,760	2,0	1235,200	13,0	95,015
	15*	95,573	1,4	1338,022	13,0	102,900
G	12	92,160	2,0	1843,200	6,7	275,105

* Durchführung des Versuches jeweils am gleichen Tier mit der Tätowierungs-Nr. 3838

II.4. Probenmaterialien

II.4.a. Spontan-Urin

Bei den Versuchen Nr. 1 bis 13 wurde zur verlustlosen Urinsammlung bei den durchwegs männlichen Versuchstieren der offene Zylinder einer 50 ml-Spritze (ohne Kolben) mit LEUKOSILK-Klebestreifen locker am Penis fixiert; die spontan gelassenen Urinmengen waren über den an der Spritzenspitze aufgesetzten Hahn in Sammelgefäße ablaßbar.
In den Sammelgefäßen befanden sich protektive Substanzen (vgl. ERSTER TEIL, Abschnitt C.II.1, Seite 12 f).

II.4.b. Katheter-Urin

Bei den Versuchen Nr. 14 und 15 wurde mit dem Ziel, eine kontinuierliche Ausscheidungskinetik zu erstellen, die Harnblase katheterisiert. Trotz Öffnung des Katheters in halbstündigen Abständen konnten nur zu den im Versuchsprotokoll vermerkten Zeiten geringe Urinportionen gewonnen werden.
Ebenfalls Vorlage von protektiven Substanzen wie oben beschrieben.

II.4.c. Venöses Blut

Der Analyse des Hirudin-Einflusses auf die Blutgerinnung diente die zusätzliche Entnahme venösen Blutes bei den Versuchen Nr. 12, 13, 14 und 15. Zur Entnahme fand wiederum die Vena femoralis Verwendung, jedoch auf der Gegenseite zur Applikationsstelle, um eine Kontamination der Blutprobe mit eventuell paravenös-subkutan gesetzten Hirudin-Depots zu vermeiden.
Nach Zentrifugation der Blutproben wurde das erhaltene Plasma der routinemäßigen Bestimmung von Gerinnungsparametern unterzogen (siehe unten).

II.5. Nachweismethoden

II.5.a. Radioimmunobioassay (RIBA)

Die Bestimmung der Hirudin-Konzentration im Urin und in der Injektionslösung erfolgte in Aliquoten der Sammelportionen respektive der applizierten Lösungen entsprechend dem im ERSTEN TEIL, Abschnitt C.II.2.a und b (Seite 13 f) beschriebenen Vorgehen.
Der Testansatz für den RIBA wurde jeweils noch am Versuchstag nach Volumen- und pH-Messung der Sammelportionen erstellt.

II.5.b. Gerinnungslabor

Veränderungen im Gerinnungsstatus post injectionem wurden durch Bestimmung des **QUICK-Wertes**, der **Partiellen Thromboplastin-Zeit** (=PTT) und der **Plasma-Thrombin-Zeit** (=PTZ) nachgewiesen.
Ergänzend zu den Parametern der plasmatischen Gerinnung wurden an korpuskulären Werten die **Thrombozytenzahl** sowie die **Leukozytenzahl** erfaßt.

Die Durchführung besorgte das Routine-Labor der Chirurgischen Klinik Innenstadt der Universität München; die Verwendung von Human-Testsätzen für Pavian-Blut bereitete bezüglich der Festsetzung der Normalwerte keine Schwierigkeiten, da in jedem Fall ein Nullwert **vor** Hirudin-Applikation ermittelt wurde.

III. ERGEBNISSE

III.1. Tierbeobachtung

III.1.a. Versuchsbegleitende Verhaltenskontrolle

Die intravenöse Injektion von Hirudin blieb bei allen Versuchstieren ohne klinisch erkennbare akute Nebenwirkungen; auch im Falle der höchsten Dosierungen (Gruppen F und G) zeigten sich keine Hinweise auf toxische oder allergische Reaktionen.
Eine geringgradige Hypersalivation trat bei jedem Versuchstier regelhaft auf und ist als Folge der Sedierung zu werten.

III.1.b. Postexperimentelle Beobachtungsphase

Sie betrug im kürzesten Fall zwei Wochen, bei den hohen Dosierungen drei bis sechs Monate.
In dieser Zeit konnten im Allgemeinzustand der Tiere (Bewegungs-, Freß- und Ausscheidungsverhalten) keine Auffälligkeiten beobachtet werden.
Keines der Versuchstiere kam im postexperimentellen Beobachtungszeitraum ad exitum; Sektionen bzw. Biopsien wurden nicht durchgeführt.

III.2. Meßwerte

III.2.a. Hirudin-Elimination

Die Meßwerte der einzelnen Versuche wie Zeitpunkt der Uringewinnung, Urinvolumen, pH-Wert und Hirudingehalt der Einzelportionen finden sich in einer tabellarischen Zusammenstellung (Tab. 6) im Anhang auf den Seiten I - VIII.

Für die Versuche Nr. 1, 12 und 15 erübrigt sich eine graphische Darstellung der Elimination, da in diesen Fällen im Versuchszeitraum von 555, 345 bzw. 365 min jeweils nur eine einzige Urinportion gewonnen werden konnte.
Bei Versuch Nr. 9 konnte im Versuchszeitraum von 365 min in keiner der fünf Urinportionen Hirudin nachgewiesen werden.

III.2.b. Veränderungen im Gerinnungsstatus

Die Meßwerte zur Gerinnung sind ebenfalls tabellarisch (Tab. 7) im Anhang auf den Seiten IX und X zusammengefaßt.

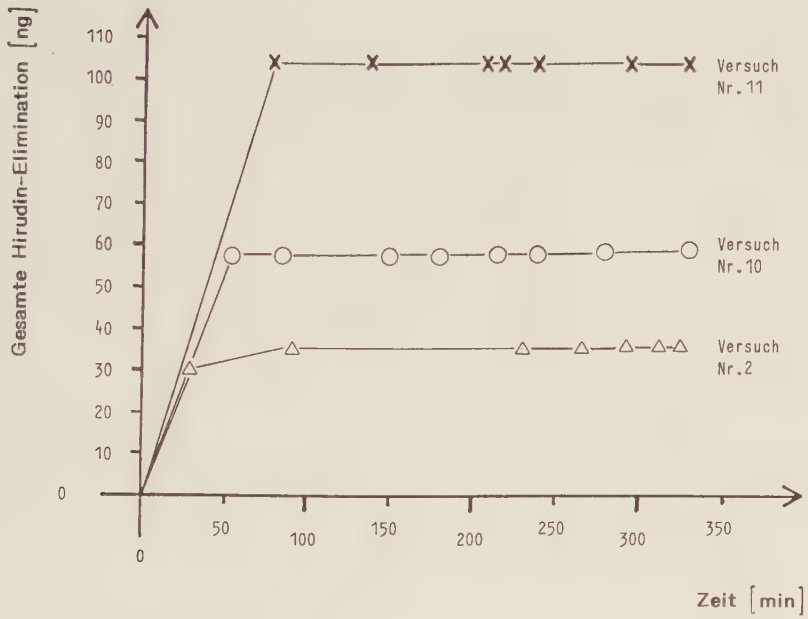
III.3. Auswertung

III.3.a. Individuelles Eliminationsverhalten

Die Abb. 26 der folgenden Seiten zeigt die kumulative renale Hirudinausscheidung in Abhängigkeit von der Zeit.

Abb. 26: Kumulative renale Hirudin-Elimination in ng nach intravenöser Applikation beim Pavian

GRUPPE A:



GRUPPEN B UND C:

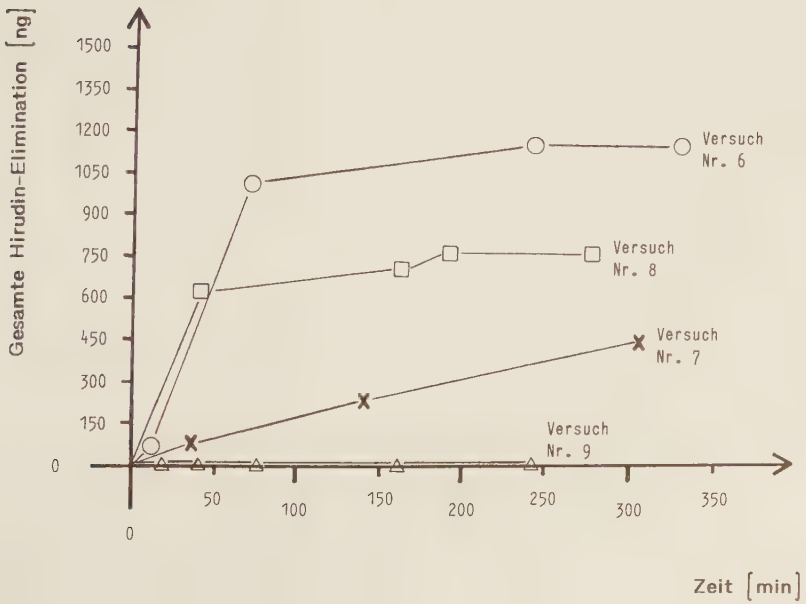
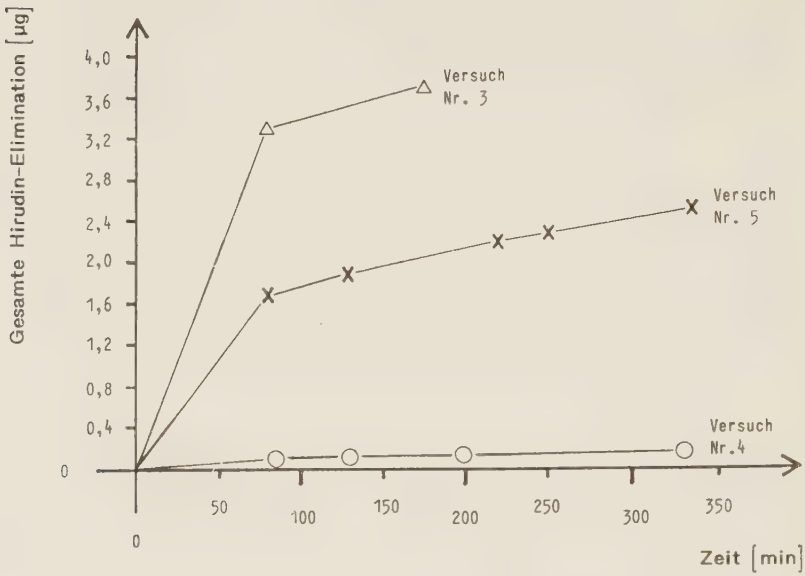
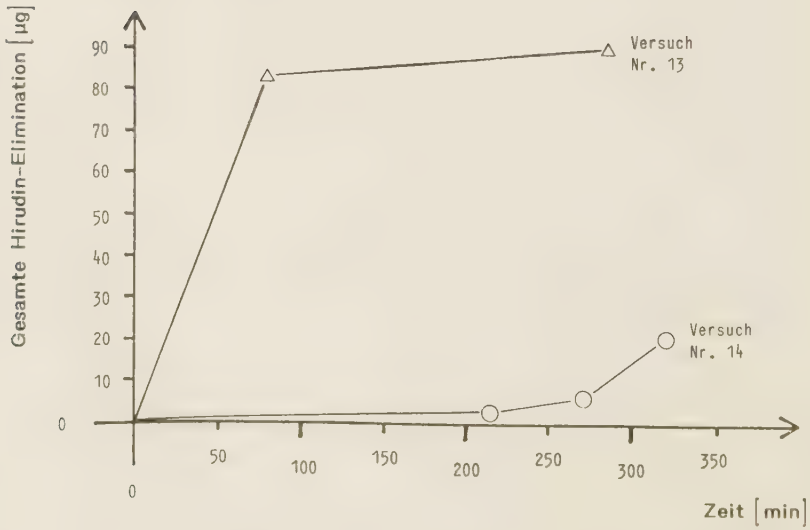


Abb. 26: (Forts.) Kumulative renale Hirudin-Elimination in ng nach intravenöser Applikation beim Pavian

GRUPPE D:



GRUPPEN E und F:



III.3.b. Applizierte Dosis und renale Elimination

Eine Zusammenstellung der absoluten und der relativen Eliminationswerte bietet die

Tab. 8: **Renale Elimination von Hirudin nach intravenöser Applikation beim Pavian**

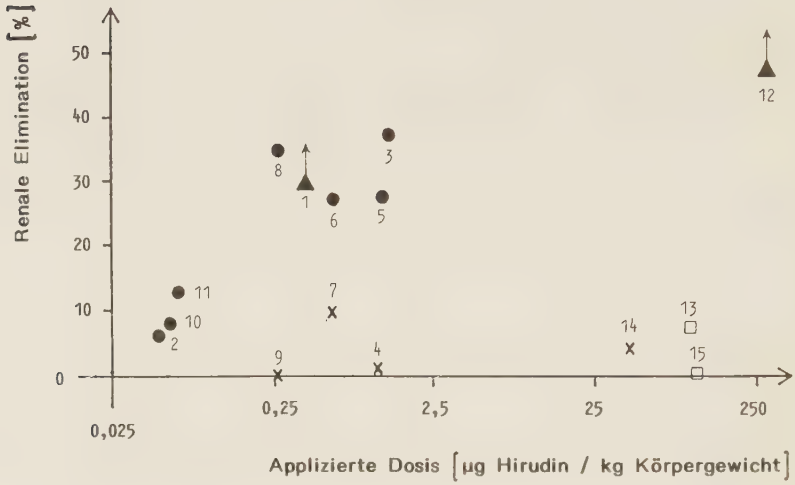
GRUPPE	Versuch Nr.	Versuchsdauer [min]	Applizierte Hirudin-Dosis [µg Hirudin / kg Körperg.]	Gesamte applizierte Hirudinmenge [µg]	Gesamte Hirudin-Elimination [µg]	Prozentuale Elimination [%]
A	2	325	0,048	0,576	0,035	6,1
	10	340	0,054	0,756	0,057	7,5
	11	340	0,063	0,819	0,104	12,7
B	8	365	0,252	2,214	0,761	34,4
	9	365	0,259	1,968	Keine meßbare Elimination	
C	1*	555	0,374	4,482	1,320	29,5
	7	360	0,564	4,797	0,447	9,3
	6	360	0,576	4,264	1,148	26,9
D	4	370	1,168	13,668	0,100	0,7
	5	370	1,215	9,112	2,486	27,3
	3	295	1,242	9,936	3,690	37,1
E	14	360	39,063	480,480	20,035	4,2
F	13*	345	95,015	1235,200	88,896	7,2
	15*	365	102,900	1338,022	2,523	0,2
G	12	345	275,105	1843,200	866,304	47,0

* Durchführung des Versuches jeweils am gleichen Tier mit der Tätowierungs-Nr. 3838

Die graphische Darstellung der gewonnenen Eliminationswerte in Abhängigkeit von der applizierten Dosis zeigt die Abb. 27 der folgenden Seite.

Abb. 27: Intravenös applizierte Hirudin-Dosis und prozentuale renale Elimination beim Pavian

(Die Zahlen bei den Meßpunkten bezeichnen die Versuchs-Nummer)



Legende:

● Versuche, bei denen die kumulative Darstellung der Elimination die Plateauphase erreicht (Nr. 2, 6, 8, 10, 11 und 13) bzw. weitgehend erreicht (Nr. 3 und 5) hat.

(Vgl. Abb. 26, Seite 80/81)

▲ Versuche, bei denen die Elimination nur durch **einen** Meßwert bestimmt werden konnte; die Hirudin-Ausscheidung war hier innerhalb der Versuchszeit sehr wahrscheinlich noch nicht beendet, sodaß u.U. eine höhere als die eingetragene prozentuale Elimination anzunehmen ist (Nr. 1 und 12).

X Versuche, die im Vergleich zu anderen Versuchen mit analoger Applikationsdosis ein abweichendes individuelles Eliminationsverhalten zeigten:

Nr. 9: Keine meßbare Ausscheidung an Hirudin

Nr. 4: Minimale prozentuale Elimination (0,7 %)

Nr. 7: Mäßige prozentuale Elimination (9,3 %)

Nr. 14: Mäßige prozentuale Elimination (4,2 %) bei deutlich erhöhter renaler "lag-time"

□ Mehrfach-Applikation am gleichen Tier:

Nr. 13: Zweite Injektion

Nr. 15: Dritte Injektion

III.3.c. Beeinflussung der Blutgerinnung

Abb. 28: Beeinflussung plasmatischer Gerinnungsparameter durch intravenöse Gabe von Hirudin beim Pavian

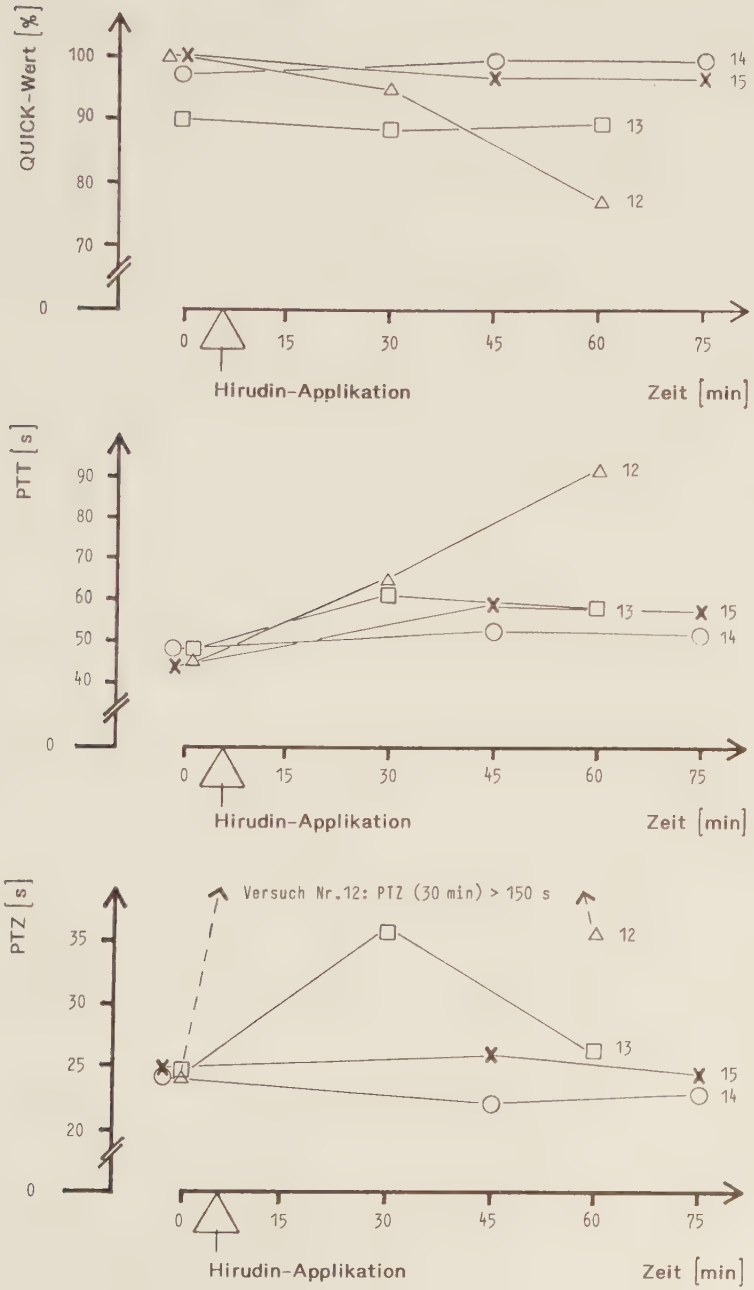
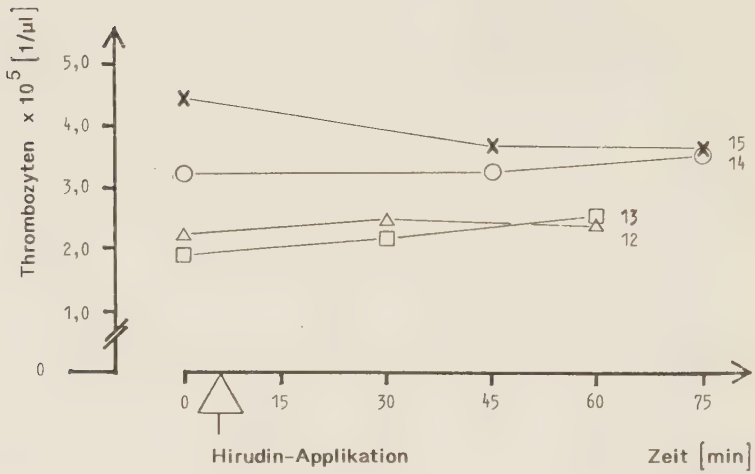
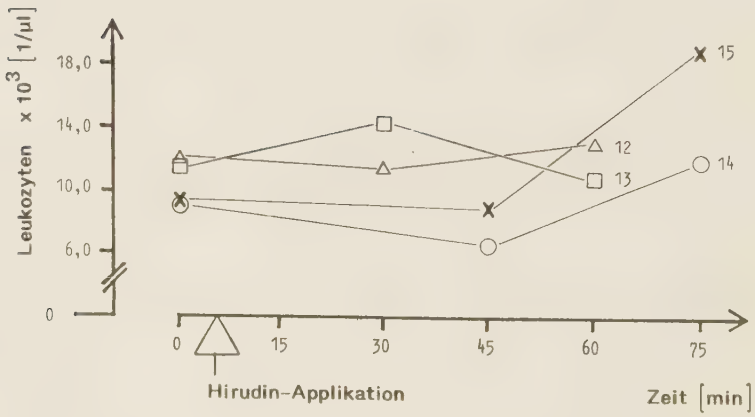


Abb. 29: Beeinflussung korpuskulärer Blutparameter durch intravenöse Gabe von Hirudin beim Pavian





III.3.d. Applizierte Dosis und Diurese

Die nachfolgende Tab. 9 gibt einen Überblick über die bei den einzelnen Versuchen im gesamten Versuchszeitraum gewonnene Anzahl an Urinportionen und deren jeweilige Gesamtmenge.

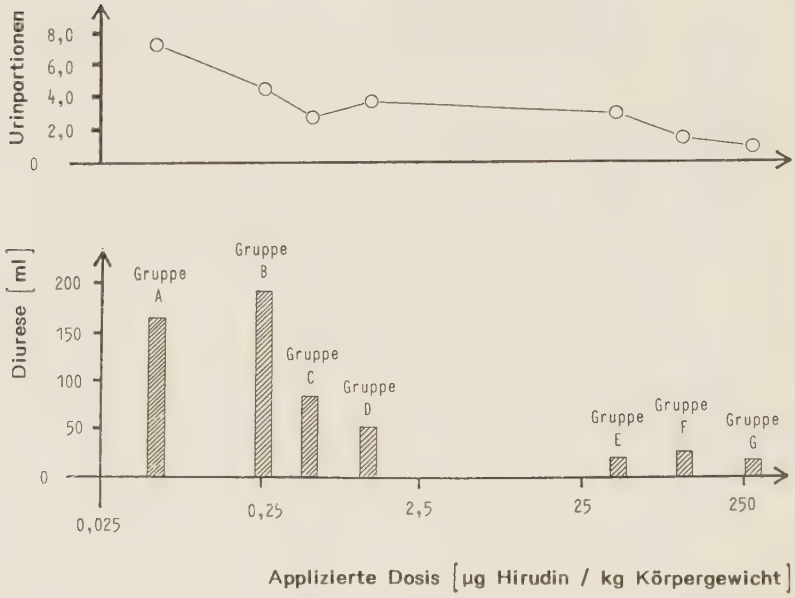
Gruppenweise wurden die resultierenden Durchschnittswerte berechnet.

Tab. 9: Diurese nach intravenöser Hirudin-Applikation beim Pavian

GRUPPE	Versuch Nr.	Versuchsdauer [min]	Applizierte Hirudin-Dosis [ug Hirudin / kg Körperg.]	Anzahl der Urinportionen: Pro Versuch	Anzahl der Urinportionen: Im Durchschnitt	Gesamte Urinausscheidung: Pro Versuch [ml]	Gesamte Urinausscheidung: Im Durchschnitt [ml]
A	2	325	0,048	7	7,3	99	165
	10	340	0,054	8		194	
	11	340	0,063	7		203	
B	8	365	0,252	4	4,5	174	194
	9	365	0,259	5		214	
C	1	555	0,374	1	2,7	45	83
	7	360	0,564	3		102	
	6	360	0,576	4		103	
D	4	370	1,168	4	3,7	37	54
	5	370	1,215	5		57	
	3	295	1,242	2		68	
E	14	360	39,063	3	3,0	20	20
F	13	345	95,015	2	1,5	48	27
	15	365	102,900	1		6	
G	12	345	275,105	1	1,0	18	18

Die Abb. 30 der folgenden Seite veranschaulicht die berechneten Werte der Tab. 9.

Abb. 30: Durchschnittliche Anzahl der Urinportionen und Urin-Gesamtausscheidung in Abhängigkeit von der intravenös applizierten Hirudin-Dosis beim Pavian



IV. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

IV.1. Renale Eliminationskinetik

Erst-Applikation (13 Versuche)

Bei den Versuchen Nr. 2, 3, 5, 6, 8, 10 und 11 (≙ 53,8 % der 13 Versuche) erreichte die kumulative Eliminationskurve im jeweiligen Versuchszeitraum von 5-6 h asymptotisch ein individuelles Maximum.

Diese Versuche zeigen eine zwar quantitativ inter-individuell unterschiedliche renale Elimination für Hirudin, dokumentieren jedoch eine zeitlich übereinstimmende Ausscheidungskinetik.

Bei den Versuchen Nr. 4, 7, 9 und 14 (≙ 30,8 % der 13 Versuche) wurde innerhalb der Versuchsdauer von 5-6 h **keine** Plateauphase der kumulativen Ausscheidung erreicht.

Bei Versuch Nr. 14 begann die Ausscheidung erst in der 215. Minute und stieg daraufhin weiter an; eine derart lange renale "lag-time" ist für die intravenöse Injektion atypisch und bisher für Hirudin nicht beschrieben. Es ist anzunehmen, daß es trotz sorgfältiger Injektionstechnik zu einer paravenösen Verabreichung der Hirudinlösung kam, sodaß ein Gewebe-Depot, näherungsweise vergleichbar der subkutanen Applikation, gesetzt wurde. Dadurch wäre die lange Verzögerungszeit der Ausscheidung hinreichend zu erklären (vgl. Seite 64).

Die Ergebnisse der Versuche Nr. 4 und 9 lassen sich in analoger Weise interpretieren: Die bekanntermaßen deutlichen inter-individuellen Schwankungen der renalen "lag-time" (PRATZEL, persönliche Mitteilung) könnten dafür verantwortlich sein, daß innerhalb von 240 min (Nr. 9) bzw. 330 min (Nr. 4) die renale Ausscheidung des in Form paravenöser Depots verabreichten Hirudins noch nicht in Gang gekommen ist.

Versuch Nr. 7 zeigt eine während der gesamten Versuchszeit konstante, mäßige Elimination, die als Ergebnis einer Überlagerung von intravenöser und paravenöser (subkutaner) Applikation gedeutet werden kann.

Bei den Versuchen Nr. 1 und 12 (≙ 15,4 % der 13 Versuche) läßt sich keine Aussage über die Ausscheidungskinetik treffen, da innerhalb des Versuchszeitraumes von 555 bzw. 345 min jeweils nur **eine einzige** Urinportion gewonnen werden konnte.

Es muß davon ausgegangen werden, daß die gemessene Elimination nicht die vollständige Ausscheidung darstellt.

Mehrfach-Applikation (2 Versuche)

Die Versuche Nr. 13 und 15 stellten die zweite bzw. dritte Hirudin-Injektion am gleichen Tier dar (erste Injektion: Versuch Nr. 1).

Trotz steigender Dosierung sank die prozentuale renale Elimination von 29,5 % (Nr. 1) über 7,2 % (Nr. 13) auf 0,2 % (Nr. 15).

Bei Versuch Nr. 15 konnte innerhalb 260 min nur eine einzige Urinportion gewonnen werden, sodaß von einer nicht vollständigen Elimination ausgegangen werden muß (siehe oben).
Andererseits wurde auch **im Versuch Nr. 13** nur eine mäßige prozentuale Elimination von 7,2 % erreicht, obwohl die kumulative Eliminationskurve durch ihre Plateauphase einen weitgehenden Abschluß der Ausscheidung nahelegt.

Es ist deshalb - neben dem Aspekt variabler renaler Anlaufzeiten - auch die Möglichkeit einer Antikörper-bedingten Reduzierung der nachweisbaren Hirudinmenge bei Mehrfach-Applikation in Betracht zu ziehen (vgl. Abschnitt IV.4, Seite 89/90).

IV.2. Applizierte Dosis und prozentuale Elimination

Die Abb. 27 (Seite 83) zeigt, daß **bei niedriger Dosierung** (Versuche Nr. 2, 10 und 11) nur eine mäßige prozentuale Elimination von **6,1 - 12,7 %** erreicht wurde, während bei **höherer Dosierung** (Versuche Nr. 1, 3, 5, 6, 8 und 12) eine Ausscheidung von **26,9 - 47,0 %** erzielt wurde.

(Die Versuche Nr. 4, 7, 9, 13, 14 und 15 blieben hierbei aus den unter Abschnitt C.IV.1., Seite 88, diskutierten Gründen außer Betracht.)

Zu erklären ist diese Beobachtung folgendermaßen:
Kleine Mengen Hirudin verteilen sich in verschiedene Kompartimente des Körpers (z.B. Organspeicherung, Bindung an Thrombin und andere Proteine usw.; vgl. Abb. 25, Seite 75) und sind dadurch primär der Bestimmung im Urin entzogen. Erst wenn eine "Basissättigung" dieser Verteilungsräume erreicht ist (durch höhere Dosierungen), kommt es zu einer relevanten Ausscheidung im Harn.

Durch die erheblichen Unterschiede in den applizierten Hirudin-Dosen (neben unterschiedlich langen Versuchszeiten) erklärt sich auch der relativ geringe **transkorporale Verlust** von 20 - 30 % bei den Versuchen von MARKWARDT[113] (Kaninchen; Dosis: 20000 und 100000 ATE/kg Körpergewicht) im Vergleich zu 53 - 94 % bei den eigenen Versuchen (Paviane; Dosis: 0,05 bis 275 µg/kg Körpergewicht entsprechend 1 bis 5500 ATE/kg Körpergewicht).

IV.3. Applizierte Dosis und Diurese

Tab. 9 (Seite 86) und Abb. 30 (Seite 87) dokumentieren eine mit steigender Hirudin-Dosis abnehmende Urinausscheidung, sowohl was die Anzahl der gewonnenen Urinportionen als auch deren Gesamtmenge betrifft.

Eine inter-individuell unterschiedliche Flüssigkeitszufuhr während der Experimente scheidet als Erklärung aufgrund der Versuchsgestaltung aus (Tiere in Narkose; keine parenterale Flüssigkeitszufuhr).
Auch das aus herstellungstechnischen Gründen im Hirudin-Lyophilisat enthaltene Mannit kommt als Ursache für die Beobachtung nicht in Frage, da Mannit als osmotisches Diuretikum die Urinausscheidung (bei entsprechender Dosierung) ganz im Gegensatz zu den Versuchsergebnissen **f ö r d e r n** würde.
Rein spekulativ bleibt ein anti-diuretischer Effekt von Hirudin selbst zu diskutieren, wobei eventuelle Sequenzanalogien zum Antidiuretischen Hormon (= ADH = Vasopressin) zu prüfen wären.

IV.4. Sensibilisierung

Die Versuche Nr. 1, 13 und 15 wurden jeweils am gleichen Tier mit der Tätowierungs-Nr. 3838 durchgeführt, sodaß dem Versuch Nr. 13 ein einmaliger und dem Versuch Nr. 15 ein zweimaliger Kontakt des Versuchstieres mit Hirudin vorausging.

Die **Abnahme** der renalen Hirudin-Elimination von 29,5 % (Versuch Nr. 1) auf 7,2 % (Nr. 13) und schließlich auf 0,2 % (Nr. 15) bei **Erhöhung** der applizierten Dosis (vgl. Tab. 8, Seite 82) läßt eine Induktion der Bildung von Antikörpern gegen Hirudin vermuten: Appliziertes Hirudin verbleibt dadurch entweder zellulär-ortständig gebunden im Organismus oder entzieht sich durch Ausscheidung als Immunkomplex dem Nachweis im RIBA.

Andererseits ist nicht mit Sicherheit auszuschließen - da Blutspiegel nicht gemessen wurden - daß bei diesen Versuchen die Applikation ebenfalls nur teilweise intravenös erfolgte (vgl. die diesbezüglichen bereits zuvor diskutierten Schwierigkeiten; Seite 88).

IV.4. Der experimentelle Nachweis gebildeter Antikörper gegen Hirudin wurde in den vorliegenden Versuchen nicht geführt; jedoch ist für das Meerschweinchen die Induktion der Antikörperbildung durch Hirudin belegt (STÖLZLE [138]), während beim Kaninchen eine denkbare Sensibilisierung fraglich ist (MARKWARDT [113]). Auch in unserer Abteilung gelang es bisher nicht, präzipitierende Antikörper gegen Hirudin im Kaninchen zu erzeugen (DIETL [133]).

IV.5. Veränderungen in der Blutgerinnung

IV.5.a. Plasmatische Parameter

Hier zeigte die höchste verwendete Dosis (Versuch Nr. 12 mit 275 µg Hirudin/kg Körpergewicht) einen signifikanten Einfluß auf den **QUICK-Wert** (23,0 % Abfall nach 60 min) und die **PTT** (98,7 % Verlängerung nach 60 min), während die niedrigeren Dosierungen diese beiden Parameter innerhalb der statistischen Schwankungsbreite unverändert ließen.

Die **PTZ** wurde sowohl im Versuch Nr. 12 (Dosis siehe oben; extreme Verlängerung auf > 150 s nach 30 min) als auch im Versuch Nr. 13 (95 µg Hirudin/kg Körpergewicht; 45,9 % Verlängerung nach 30 min) signifikant beeinflußt.

Die **PTZ** erwies sich somit sowohl in Bezug auf die eben wirksame Hirudin-Dosis als auch in Bezug auf die Schnelligkeit des Ansprechens als der **empfindlichste der verwendeten Parameter**, wobei entsprechend rasch (nach 60 min) auch die Rückkehr zum Normalwert erfolgte.

IV.5.b. Korpuskuläre Parameter

Thrombozytenzahl

Sie zeigte sich im Zeitraum bis 75 min nach Hirudin-Injektion **unbeeinflußt** durch Dosierungen von 39 bzw. 95 bzw. 103 bzw. 275 µg Hirudin/kg Körpergewicht.

Leukozytenzahl

Bei den Dosierungen 95 und 275 µg Hirudin/kg Körpergewicht (Versuche Nr. 12 und 13) ergab sich im Zeitraum bis 60 min nach Applikation **keine** signifikante Änderung in der Leukozytenzahl.

Bei den Dosierungen 39 und 102 µg Hirudin/kg Körpergewicht (Versuche Nr. 14 und 15) war die Leukozytenzahl 45 min nach Injektion ebenfalls unverändert, zeigte aber nach 75 min einen Anstieg um 31,1 bzw. 105,4 % des Ausgangswertes.

Die Tatsache, daß die beiden niedrigeren Dosierungen (Versuche Nr. 14 und 15) einen Leukozytenanstieg bewirkten, die beiden höheren (Versuche Nr. 12 und 13) jedoch nicht, ist zunächst nur durch die unterschiedlichen Blut-Entnahmezeiten erklärlich:
Das Ergebnis könnte man dahingehend interpretieren, daß die Leukozytenzahl erst **nach** 1 h post injectionem zu steigen beginnt. Wäre bei den Versuchen Nr. 12 und 13 ebenfalls nach 75 min eine Blutentnahme durchgeführt worden, hätte u.U. auch in diesen Fällen ein Leukozytenanstieg festgestellt werden können.
Andererseits ist bisher eine Veränderung der Leukozytenzahl nach Hirudinapplikation noch nie beobachtet worden. Es muß deshalb dahingestellt bleiben, inwieweit es sich hier um eine individuelle Reaktion der Versuchstiere auf die Injektion (unabhängig von der injizierten Substanz) handelt.

IV.6. Systemische Verträglichkeit

Das Fehlen toxischer oder allergischer Nebenwirkungen sowie die blande Beeinflussung der Blutgerinnung beim Pavian unter den verwendeten Dosierungen (kein Totalausfall der Gerinnung; kein Thrombozytensturz etc.) ließen spätere intravenöse Hirudingaben beim Menschen (nach weiteren Vorversuchen zur Sicherung der Unbedenklichkeit) verantwortbar erscheinen.

Die Feststellung einer guten systemischen Verträglichkeit deckt sich auch mit den Beobachtungen von MARKWARDT [113], der Nebenwirkungen auf Verunreinigungen zurückführt, **nicht** aber auf die Reinsubstanz Hirudin.

*

D. RENALE HIRUDIN-ELIMINATION NACH TOPISCHER APPLIKATION BEIM MENSCHEN

I. SPONTANE PERKUTANE ABSORPTION

I.1. Versuchsziel

Durch Urinanalyse auf Hirudin nach topischer Applikation von hirudinhaltiger Salbe sollte beim Menschen die perkutane Absorption nachgewiesen werden.

I.2. Experimentelle Durchführung

I.2.a. Probanden

An 2 Probanden wurde je ein Erstversuch durchgeführt, sowie an einer der beiden Versuchspersonen nach Ablauf von 5 Monaten ein Wiederholungsexperiment mit erhöhter Applikationsmenge.

Bei den Probanden wurde auf die Erfüllung folgender Voraussetzungen geachtet:

- Negative Allergie-Anamnese
- Keine Erkrankung, insbesondere keine Dermatosen und keine Einschränkung der Nierenfunktion
- Keine Medikamentenanwendung (weder Externa noch Interna) vor (mindestens 2 Wochen) und während der Versuchsdurchführung
- Bisher kein Kontakt mit hirudinhaltigen Substanzen (bei den Erstversuchen)

Probandenspezifische Daten:

Proband:	R.G.	W.R.
Versuchs-Nr.:	1 und 3	2
Geschlecht:	männlich	männlich
Alter [a]:	26	32
Körpergewicht [kg]:	67	65
Körpergröße [cm]:	173	186
Haarfarbe:	mittelblond	mittelblond
Hauttyp:	mittlerer Pigmentierungsgrad	mittlerer Pigmentierungsgrad
	In beiden Fällen keine wesentliche Behaarung der Applikationsareale	
Konstitutionstyp: (nach KRETSCHMER)	Athletisch-pyknischer Mischtypus	Leptosomer Typus

I.2.b. Verwendetes Applikat

Zur Anwendung gelangte Hirudin-Rohextrakt-Salbe der Firma PLANTORGAN in einer Sonderzubereitung der Chargenbezeichnung HE 102 mit einer spezifischen Aktivität von **50000 ATE/°g Salbe** entsprechend einem Hirudingehalt von **2,5 mg Hirudin/°g Salbe.**

I.2.c. Versuchsgestaltung

Salbenapplikation

Bei den beiden Erstversuchen wurde auf dem Rücken des Probanden eine Fläche von 30 cm x 30 cm = 900 cm² markiert und innerhalb dieses Areals die vorgesehene Menge an Hirudin-Rohextrakt-Salbe in einer Portion mittels eines Metallspatels leicht massierend gleichmäßig aufgetragen. Durch Differenzwägung von Vorratsgefäß und Spatel wurde die aufgetragene Salbenmenge genau bestimmt.

Beim Wiederholungsversuch (Nr. 3) wurde sowohl auf dem Rücken als auch auf der Brust auf je 30 cm x 30 cm = 900 cm², insgesamt also auf eine Fläche von 1800 cm², Salbe appliziert. Das Aufbringen der Salbe erfolgte in 3 Portionen in Abständen von 150 bzw. 420 min zur ersten Applikation in annähernd gleichen Mengen (siehe Tab. 10 unten und Seite 99).

Tab. 10: Applikationsmengen an Hirudin-Rohextrakt-Salbe im Humanversuch

Versuch	Salbenauftrag	Applikationsfläche	Aufgetragene Salbenmenge	Aufgetragene Hirudinmenge	Aufgetragene Flächenbeladung
Nr.	Nr.	[m²]	[°g]	[mg]	[mg Hirudin / m² Haut]
1	I	0,09	4,9	12,25	136,1
2	I	0,09	5,3	13,25	147,2
3	I	0,18	10,1	25,25	140,3
	II	0,18	8,5	21,25	118,1
	III	0,18	9,5	23,75	131,9
	Insgesamt	0,18	28,1	70,25	390,3

Okklusionsverband

Nach Abschluß des Salbenauftrags wurde mittels handelsüblicher Klarsicht-Frischhaltefolie und LEUKOSILK-Klebestreifen das bestrichene Areal mit einem Okklusionsverband versehen.

Bei Versuch Nr. 3 wurde der Okklusionsverband vor jeder neuen Applikation entfernt, die bezeichnete Fläche durch feuchtes Abwischen von Salbenrückständen befreit, neue Salbe aufgetragen und wieder in gleicher Weise okklusiv abgedeckt.

Der Verband verblieb bis 6 Stunden nach dem (bei Versuch Nr. 3: letzten) Salbenauftrag und wurde dann entfernt. Anschließend erfolgte die Beseitigung der Salbenrückstände durch normales Duschen.

Versuchsdauer

An die Frühphase der Experimente (Okklusionsverband) schloß sich die Langzeitphase der Urinsammlung an, bei Versuch Nr. 1 über 72 h, bei Versuch Nr. 2 über 144 h und bei Versuch Nr. 3 über 336 h, jeweils gemessen ab Beginn der (ersten) Salbenapplikation.

Probandenverhalten

Während der gesamten Versuchsdauer gingen die Probanden in normaler Weise ihrer nicht-körperlichen Arbeit nach; Sport, Sauna sowie übermäßige Flüssigkeitszufuhr (Konzentrationsverminderung!) wurden vermieden, ansonsten galten jedoch keine spezifischen Einschränkungen.

Urinsammlung

Von jeder der drei Versuchspersonen wurde **vor** der Salbenanwendung Urin zur Leerwert-Kontrolle gewonnen.
Nach Salbenauftrag wurde Spontanurin **verlustlos** über die in Tab. 11 (Seite 95) angegebenen Intervalle gesammelt. Die Vorlage protektiver Substanzen in den Sammelgefäßen entsprach dabei den im ERSTEN TEIL, Abschnitt C.II.1 (Seite 12/13) genannten Werten.
Während der Sammelintervalle wurde der Urin bei +4°C gelagert, nach Ablauf des Intervalls bis zum Versuchsende bei -20°C eingefroren.
Nach Abschluß der gesamten Sammelperiode erfolgte nach dem Auftauen der Urinproben im Wasserbad und vor der Aufarbeitung von Aliquoten für den RIBA die Volumen- und pH-Messung der einzelnen Intervallportionen.

Blutentnahme

Beim Wiederholungsversuch (Nr. 3) wurde zusätzlich zur Urinsammlung zu den angegebenen Zeiten venöses Blut zur Kontrolle der Gerinnung entnommen.

I.2.d. Nachweismethoden

Die Untersuchung der Urinproben auf Hirudin geschah mit Hilfe des RIBA nach Durchführung der im ERSTEN TEIL, Abschnitt C.II.2.c (Seite 14-16) beschriebenen Probenvorbereitung.

Ergänzend wurden bei Versuch Nr. 3 plasmatische und korpuskuläre Gerinnungsparameter bestimmt.

(Die Ausführung besorgte das Routinelabor der Chirurgischen Klinik Innenstadt der Universität München.)

I.3. Ergebnisse

I.3.a. Begutachtung der bestrichenen Haut

In allen drei Versuchen wies die Haut nach Abnahme der Okklusionsverbände nur geringe erythematische Erscheinungen auf, deren Intensität nicht über das aufgrund der physikalischen Reizung zu erwartende Ausmaß hinausging.
Eine makroskopisch erkennbare kutane Veränderung infolge einer eventuell stattgefundenen Sensibilisierung konnte im Versuch Nr. 3 nicht beobachtet werden (kein allergisches Exanthem etc.).

I.3.b. Meßwerte

Erstversuche Nr. 1 und 2

Die in den einzelnen Sammelintervallen nachweisbaren Hirudin-Ausscheidungen sind in der nachfolgenden Tab. 11 zusammengefaßt:

Tab. 11: Renale Hirudin-Ausscheidung nach topischer Applikation beim Menschen

		Versuch Nr.1				Versuch Nr.2			
SAMMEL-INTERVALL		Urinmenge	pH-Wert	Hirudin pro Intervallportion	Hirudin kumulativ	Urinmenge	pH-Wert	Hirudin pro Intervallportion	Hirudin kumulativ
Nr.	[h] *	[ml]		[ng]	[ng]	[ml]		[ng]	[ng]
1	0 - 12	310	5,7	ø	ø	500	6,4	ø	ø
2	12 - 24	490	6,3	ø	ø	500	5,7	ø	ø
3	24 - 36	480	6,6	ø	ø	370	5,5	ø	ø
4	36 - 48	480	5,8	51,2	51,2	250	5,2	ø	ø
5	48 - 60	410	6,0	30,1	81,3	270	5,2	ø	ø
6	60 - 72	490	6,1	45,7	127,0	230	5,3	53,7	53,7
7	72 - 84	---	---	----	----	470	5,7	50,1	103,8
8	84 - 96	---	---	----	----	310	5,4	49,6	153,4
9	96 -108	---	---	----	----	280	5,3	69,1	222,5
10	108 -120	---	---	----	----	260	5,3	24,3	246,8
11	120 -132	---	---	----	----	230	5,4	49,1	295,9
12	132 -144	---	---	----	----	380	5,2	ø	295,9

* Zeitmessung ab Beginn der Salben-Applikation
ø Mit dem RIBA kein Hirudingehalt nachweisbar

Wiederholungsversuch Nr. 3

Es wurde über insgesamt 31 Intervalle Urin gesammelt:
Die ersten vier Intervalle erstreckten sich über die Zeiträume 0-110 min, 110-380 min, 380-510 min und 510-900 min ab Beginn des ersten Salbenauftrags. Alle weiteren Intervalle umfaßten jeweils 12 h und reichten bis zur 336. Stunde (≙ 14 Tage) nach der ersten Einreibung.

In keiner einzigen der gewonnenen Urinportionen konnte mit dem RIBA Hirudin nachgewiesen werden.

Die RIBA-Bindungsraten bewegten sich ausschließlich in einem Bereich von 80,7 - 101,2 %, was auf der zugehörigen Standard-Eichkurve stets einem Nullwert entspricht. Die zur Kontrolle getesteten Leerwerte ergaben Bindungsraten von 85,8 - 93,3 %.

Die Bestimmung der Blutgerinnungsparameter bei Versuch Nr. 3 erbrachte folgende Werte:

Tab. 12: Blutgerinnungsparameter nach Applikation von Hirudin-Rohextrakt-Salbe beim Menschen im Wiederholungsversuch

Zeit nach erster Applikation [min]	QUICK	PTT	PTZ	Thrombozyten	Leukozyten
	[%]	[s]	[s]	$\left[\frac{1}{\mu l}\right] \times 10^5$	$\left[\frac{1}{\mu l}\right] \times 10^3$
30	100	35,4	20,3	2,78	5,8
150 (≙ 30 min nach der 2.Applik.)	100	37,3	20,1	2,56	5,6
465 (≙ 45 min nach der 3.Applik.)	100	38,1	20,8	2,63	5,1
Am Ende der Sammelperiode (nach 14 d)	100	34,8	17,9	2,49	5,2

Für die verwendeten Testsätze zur Bestimmung der angegebenen Parameter gelten folgende **Normbereiche**:

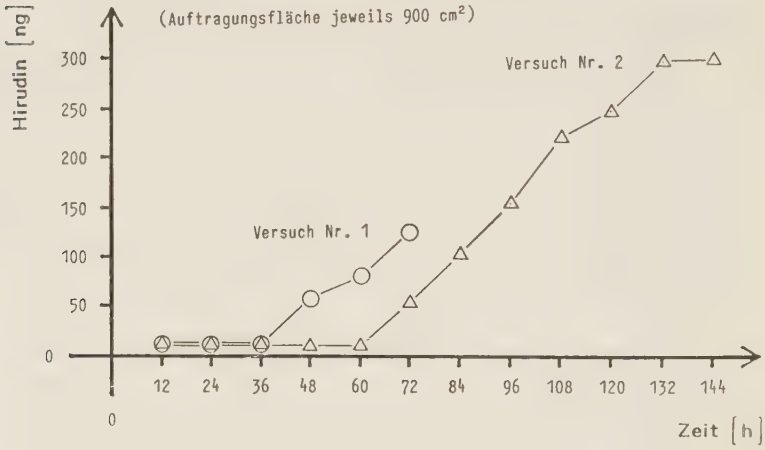
QUICK-Wert:	70-100 [%]
PTT:	30-50 [s]
PTZ:	17-24 [s]
Thrombozyten:	150000 - 390000 [1/µl]
Leukozyten:	4000 - 9000 [1/µl]

I.3.c. Auswertung

Erstversuche Nr. 1 und 2

Graphische Auswertung:

Abb. 31: **Kumulative renale Hirudin-Elimination (in ng) beim Menschen nach topischer Applikation von Hirudin-Rohextrakt-Salbe**



Rechnerische Auswertung

Aus den gewonnenen Meßwerten wurden die Parameter der Elimination nach Permeation berechnet:

	EP	SEP	ERP	SERP
Nr.1	1411,1 $\left[\frac{ng}{m^2}\right]$	564,4 $\left[\frac{°\mu g}{m^2}\right]$	38,1 $\left[\frac{ng}{m^2 \cdot h}\right]$	15,2 $\left[\frac{°\mu g}{m^2 \cdot h}\right]$
	Kumulationszeit T = 72 h		Intervallzeit t = 36 h (36 - 72 h)	
Nr.2	3287,8 $\left[\frac{ng}{m^2}\right]$	1315,1 $\left[\frac{°\mu g}{m^2}\right]$	46,1 $\left[\frac{ng}{m^2 \cdot h}\right]$	18,4 $\left[\frac{°\mu g}{m^2 \cdot h}\right]$
	Kumulationszeit T = 144 h		Intervallzeit t = 72 h (60 - 132 h)	

Die Ermittlung der Eliminations-Raten erfolgte analog zum Vorgehen beim Schweine-Versuch (vgl. Abschnitt A.III.2, Seite 63) durch Regressionsrechnung im Bereich der konstanten Ausscheidung. Der Korrelationsfaktor betrug dabei +0,996 bei einem Signifikanzniveau von 0,004 (Versuch Nr. 1) bzw. +0,997 bei einem Signifikanzniveau von 0,001 (Versuch Nr. 2).

Wiederholungsversuch Nr. 3

Die in Abhängigkeit von der Hirudin-Applikation untersuchten Blutgerinnungsparameter überschritten in **keinem** Fall die Grenzen der Normbereiche. Die maximale Abweichung vom Kontrollwert (bestimmt am Ende der Sammelperiode nach 14 Tagen) betrug für

den QUICK-Wert 0 %
die PTT + 1,7 bis 9,5 %
die PTZ +12,3 bis 16,2 %
die Thrombozytenzahl +2,8 bis 11,6 %
die Leukozytenzahl +11,5 bzw. -1,9 %

Hirudin konnte mit dem RIBA in **keiner** der Urin-Intervallportionen nachgewiesen werden (vgl. Seite 96).

I.4. Diskussion und Beurteilung der Ergebnisse

I.4.a. Permeationsparameter

Vergleich der Werte der Human-Versuch Nr. 1 und 2
(Vgl. Seite 97)

Die Eliminations-Raten der beiden Versuche stimmen quantitativ überein.

Die nur halb so große kumulative Ausscheidung beim Versuch Nr. 1 im Vergleich zu Nr. 2 findet ihre Erklärung in der nur halb so langen Versuchsdauer.

Die um 24 h differierenden Anlaufzeiten der Hirudin-Elimination sind Ausdruck einer deutlichen inter-individuellen Varianz, wie sie bereits beim Pavian nach intravenöser (paravenös-subkutaner) Applikation beobachtet und diskutiert wurde (vgl. Seite 88).

Vergleich mit den Werten des Schweine-Versuches
(Vgl. Seite 62/63)

EP (Schwein; T = 6 h) = 1,8 [ng/cm²] (0,08 ‰)

EP (Mensch Nr. 1; T = 72 h) = 0,14 [ng/cm²] (0,01 ‰)

EP (Mensch Nr. 2; T = 144 h) = 0,33 [ng/cm²] (0,02 ‰)

Obwohl im Schweine-Versuch die maximale Sammelperiode mit einer Kumulationszeit von T = 6 h erheblich kürzer war als beim Human-Versuch mit T = 72 h (Nr. 1) bzw. T = 144 h (Nr. 2) wurden **beim Schwein** kumulative Permeationswerte erreicht, die **um den Faktor 5 bis 13 höher** liegen als beim Menschen.
Die Promille-Angaben im Anschluß an die Permeationsparameter bezeichnen den Anteil der renalen Elimination im Beobachtungszeitraum an der auf die Haut aufgetragenen Hirudinmenge.

ERP (Schwein; t = 90 min) = 1,0 [ng/cm²·h]

ERP (Mensch Nr. 1; t = 36 h) = 0,0038 [ng/cm²·h]

ERP (Mensch Nr. 2; t = 72 h) = 0,0046 [ng/cm²·h]

Der Vergleich der Eliminations-Raten zeigt:

- Die Eliminations-Rate nach Permeation ERP ist **beim Schwein um den Faktor ~ 240 größer** als beim Menschen.
  Dies steht in prinzipiellem Einklang mit Angaben der Literatur über die Hautpermeabilität verschiedener Spezies; nach TREGEAR [125] zeigt die Hautpermeabilität (gemittelt über eine Auswahl von Testsubstanzen) eine fallende Tendenz in der Reihe:

  Kaninchen > Ratte > Meerschweinchen > Schwein > Mensch

- Die Verzögerungszeit (renale "lag-time", vgl. Seite 64) bis zum Beginn der konstanten Hirudin-Ausscheidung im Urin weist erhebliche Unterschiede auf: So betrug diese Zeit t_o beim Schwein 270 min, während die Hirudin-Elimination beim Menschen erst nach 36 bzw. 60 h nach Salbenapplikation einen meßbaren konstanten Wert erreichte.

- Die Intervallzeiten t, in denen eine konstante Ausscheidung an Hirudin nachzuweisen war, betrug im Schweine-Versuch 90 min, bei den Human-Versuchen 36 bzw. 72 h. Diese Zeiten stellen jedoch sehr wahrscheinlich nicht die vollständige Dauer der konstanten Ausscheidungsphase dar, da die Versuche endeten, bevor ein Sistieren der Elimination erkennbar wurde (Ausnahme: fragliches Ende im Human-Versuch Nr. 2 nach 132 h).

(Analoges gilt jeweils für die SEP und die SERP, da die Hirudin-Konzentration in der applizierten Salbe stets gleich war.)

I.4.b. Eliminationskinetik

Die Versuche Nr. 1 und 2 weisen eine prinzipiell gleichartige Eliminationskinetik auf:
Die Hirudin-Ausscheidung kommt erst nach einer individuell unterschiedlich langen (36 bzw. 60 h) Verzögerungszeit in Gang und bleibt dann über viele Stunden konstant (mindestens 36 h bei Nr. 1, 72 h bei Nr. 2).

Da injiziertes Hirudin relativ schnell ausgeschieden wird (vgl. Pavian-Versuche: Abb. 26, Seite 80/81), ist die langanhaltende Elimination nach topischer Anwendung beim Menschen nur durch einen Depot-Effekt zu erklären; in erster Linie ist hier das Stratum corneum der Epidermis als verantwortliches Depot zu nennen (vgl. Seite 36).

Die Kombination von schneller renaler Elimination bei langsamem und quantitativ geringem perkutanen Durchtritt erlaubt es, die durch Eliminationsmessung gewonnenen Parameter EP, SEP, ERP und SERP näherungsweise den Parametern der perkutanen Permeation HP, SHP, HPR und SHPR gleichzusetzen (siehe hierzu ZWEITER TEIL, Abschnitt C.II.3, Seite 46).

I.4.c. Mehrfach-Applikation

Bei Versuch Nr. 3 erfolgte eine Mehrfach-Applikation in doppelter Hinsicht:

- Beim Probanden des Versuches Nr. 3 war bereits 5 Monate zuvor Hirudin topisch appliziert worden (Versuch Nr. 1).
- Die Hirudin-Applikation in Versuch Nr. 3 erfolgte zeitlich versetzt in 3 Portionen: Die Salben-Gesamtmenge von 28,1 °g wurde im Abstand von 2,5 h (1./2. Applikation) bzw. 4,5 h (2./3. Applikation) in annähernd gleichen Portionen aufgetragen (siehe Tab. 10, Seite 93).

Trotz ~5-fach erhöhtem Hirudin-Gesamtauftrag gegenüber den Versuchen Nr. 1 und 2 konnte im Wiederholungsversuch Nr. 3 in keiner einzigen Urinportion Hirudin mit dem RIBA nachgewiesen werden. Diese Beobachtung steht in Analogie zu der stark verminderten Elimination des Hirudins nach wiederholter intravenöser Gabe beim Pavian (vgl. Abschnitt C.IV.4, Seite 89/90).

Unter Umständen ist von einer Sensibilisierung bei der ersten Hirudin-Applikation auszugehen, wodurch bei späteren Anwendungen die renal eliminierte Hirudinmenge auf Quantitäten unterhalb der Nachweisgrenze des RIBA abgesenkt bzw. zu Ausscheidungsformen (Immunkomplexe) verändert wird, die sich dem RIBA-Nachweis a priori entziehen.
Dabei scheidet jedoch eine Mastzellen-vermittelte IgE-Bildung trotz lokaler Applikation des Hirudins aus, da sich diese durch entsprechende allergische Hautreaktionen bei der wiederholten Anwendung bemerkbar gemacht hätte. Es ist demnach die Bildung nicht-präzipitierender IgG-Antikörper zu diskutieren, die das applizierte Hirudin ggf. binden und so der renalen Elimination entziehen.
Nicht auszuschließen ist auch die Bildung von Antikörpern gegen Hirudin-assoziierte Begleitsubstanzen des Rohextraktes, wobei derselbe Effekt zu erwarten wäre. Diese Fragen bedürfen einer weiteren Klärung.

I.4.d. Blutgerinnung

Blutgerinnungsparameter wurden nur beim Wiederholungsversuch Nr. 3 bestimmt.
Eine **signifikante Beeinflussung** der Gerinnung muß **verneint** werden, da sämtliche Werte im Normbereich blieben.
Die Tendenz zu einer minimalen Gerinnungshemmung (innerhalb der Grenzen des Normalbereiches) ist jedoch nicht auszuschließen, zumal die größte prozentuale Abweichung vom Kontrollwert die PTZ aufweist (+12,3 bis 16,2 %; siehe Seite 97); sie wurde bereits bei den Pavian-Versuchen als der sensitivste der untersuchten Parameter erkannt (vgl. Abschnitt C.IV.5.a, Seite 90).

II. PERKUTANE ABSORPTION IM ELEKTRISCHEN FELD

II.1. Versuchsziel

Im Vergleich mit den vorausgegangenen Human-Versuchen zur spontanen Absorption sollte die Bedeutung der Einwirkung eines elektrischen Gleichstromfeldes auf die perkutane Aufnahme von Hirudin beim Menschen untersucht werden (vgl. ZWEITER TEIL, Abschnitt E.I.4, Seite 52).

II.2. Experimentelle Durchführung

Es handelt sich um einen exemplarischen Einzelversuch.

II.2.a. Proband

Die geforderten allgemeinen Prämissen entsprachen denen der vorangegangenen Versuche (siehe Seite 92).

Probandenspezifische Daten:

Proband:	H.P.
Geschlecht:	männlich
Alter [a]:	48
Körpergewicht [kg]:	79
Körpergröße [cm]:	182
Haarfarbe:	hellblond/grau
Hauttyp:	hell Keine wesentliche Behaarung des Applikationsareals
Konstitutionstyp: (nach KRETSCHMER)	Athletisch-leptosomer Mischtypus

II.2.b. Verwendetes Applikat

Aufgetragen wurde Hirudin-Rohextrakt-Salbe der Firma PLANTORGAN in einer Sonderzubereitung der Chargenbezeichnung HE 102 mit einer spezifischen Aktivität von **50000 ATE/°g Salbe** entsprechend einem Hirudingehalt von **2,5 mg Hirudin/°g Salbe.**

II.2.c. Versuchsgestaltung

Salbenapplikation

5,0 °g der Salbe (Bestimmung durch Differenzwägung) wurden auf eine Fläche von 38 cm x 47 cm = 1786 cm² auf dem Rücken des Probanden appliziert. Die Auftragung erfolgte mit behandschuhtem Finger unter leichtem Massieren bei gleichmäßiger Verteilung.

Aus den genannten Daten resultiert eine Flächenbeladung der bestrichenen Haut von 70,0 mg Hirudin/m² Haut.

Die salbenbestrichene Fläche wurde zur Bildung einer okklusiven Kammer mit einer elektrisch leitfähigen Zellophanfolie abgedeckt, die somit auch während der Stromphase (siehe nächste Seite) verbleiben konnte.

Versuchsdauer

Der Versuch erstreckte sich über 8 h.

Elektrisches Feld

Ab Ende der 3. Versuchsstunde wurde für die Dauer von 3,0 h durch Anbringen von Flächenelektroden auf Brust (Anode; Referenzelektrode) und Rücken (Kathode; Arbeitselektrode) ein elektrisches Gleichstromfeld geschaffen.
Die metallischen Elektroden waren durch 4 cm dicke angefeuchtete (Leitungswasser) Viskoseschwämme unterlegt. Die Fläche der Elektroden stimmte mit dem Applikationsareal (entsprechend gewählt) überein.

Durch eine Spannung von 29,5 V wurde ein Stromfluß von 183,5 mA erreicht; dies entspricht bei der gegebenen Fläche von 1786 cm^2 einer **Stromdichte von 0,1 mA/cm^2** (vgl. Iontophorese, Seite 52).

Probandenverhalten

Im Gegensatz zu den vorhergehenden Versuchen wurde durch orale Flüssigkeitsaufnahme (Tee) die Diurese gesteigert, um innerhalb des Versuchszeitraumes von 8 h möglichst viele Urinportionen gewinnen zu können.
Während des Experimentes befand sich der Proband unter Laborbedingungen in körperlicher Ruhe.

Urinsammlung

Es konnten in halbstündigen Abständen Urinportionen per viam naturalem gewonnen werden.
Auf die Vorlage protektiver Substanzen wurde in diesem Versuch verzichtet.
Die Lagerung des Probenmaterials bis zur Aufarbeitung wurde wie zuvor beschrieben (Seite 94) durchgeführt.

II.2.d. Nachweismethode

Die Hirudin-Detektion in den Urinportionen erfolgte im RIBA mittels des 100 µl-Direkteinsatzes (vgl. ERSTER TEIL, Abschnitt C.II.2.a, Seite 13).

II.3. Ergebnisse

II.3.a. Verlaufsbeobachtung

Während der Einwirkung des elektrischen Feldes kam es zu geringfügigen strombedingten Mißempfindungen, die aber nicht den Abbruch des Versuches oder die Änderung von Parametern erzwangen.

Nach Abklingen der strombedingten Hyperämie kam es in den Folgetagen, verstärkt ab dem 4. Tag nach dem Versuch, im Bereich des Applikationsareals zu einem erheblich juckenden, bläschen-bildenden Erythem, das ab dem 7. Tag die Behandlung mit einem Corticosteroid-haltigen Externum erforderlich machte. Die Therapie führte zu einer Rückbildung ad integrum.

II.3.b. Meßwerte

Die ermittelten Meßwerte sind in Tab. 13 zusammengefaßt:

Tab. 13: Renale Hirudin-Ausscheidung beim Menschen unter Iontophorese nach topischer Applikation von Hirudin-Rohextrakt-Salbe

Urinportion	Zeit nach Salbenauftrag	Urinvolumen	Hirudingehalt der Urinportion	Gesamte Hirudinmenge der Intervallportion	Kumulative Hirudinausscheidung
Nr.	[h]	[ml]	[ng/100 µl]	[µg]	[µg]
1	1,0	30,9	∅	∅	∅
2	1,5	19,7	∅	∅	∅
3	2,0	23,3	∅	∅	∅
4	2,5	16,7	∅	∅	∅
5	3,0	29,4	∅	∅	∅
Elektroden angelegt; Beginn des Stromflusses.					
6	3,5	27,5	0,6	0,165	0,165
7	4,0	34,9	2,4	0,838	1,003
8	4,5	59,9	5,2	3,115	4,118
9	5,0	73,8	4,2	3,100	7,218
10	5,5	251,3	0,8	2,010	9,228
11	6,0	459,2	1,2	5,510	14,738
Ende des Stromflusses; Elektroden abgenommen.					
12	6,5	120,1	3,5	4,204	18,942
13	7,0	24,0	6,2	1,488	20,430
14	7,5	68,6	2,3	1,578	22,008
15	8,0	110,0	0,9	0,990	22,998

∅ Mit dem RIBA kein Hirudingehalt nachweisbar

II.3.c. Auswertung

Graphische Auswertung

Abb. 32: Standardisierte Eliminationsraten $E_{stand.}$ für Hirudin beim Menschen unter Iontophorese

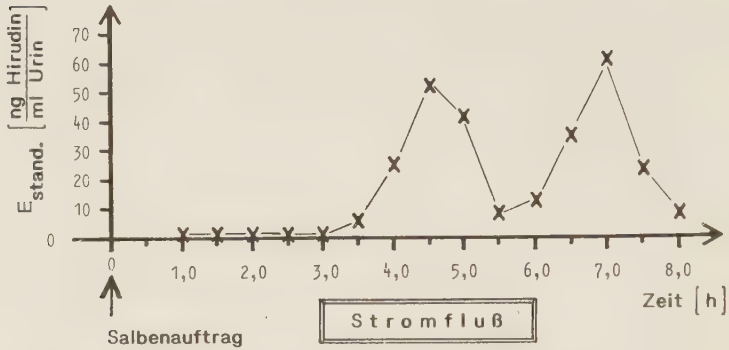
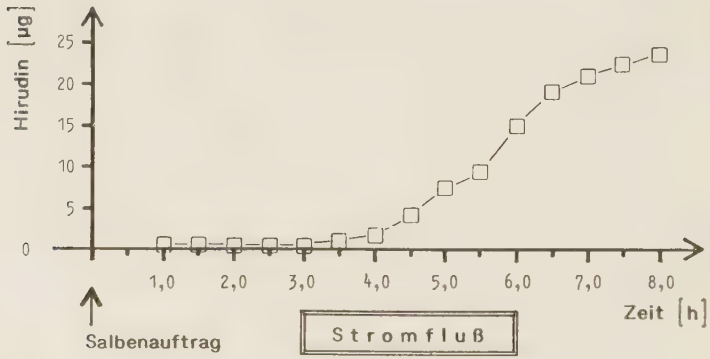


Abb. 33: Kumulative renale Hirudin-Ausscheidung beim Menschen unter Iontophorese



Rechnerische Auswertung

Wie beim Schweine-Versuch (Abschnitt A, Seite 63) und beim Human-Versuch ohne Stromeinwirkung (Abschnitt D, Seite 97) wurden aus den Meßwerten die Parameter zur Elimination nach Permeation errechnet; die Eliminations-Raten wurden wiederum durch Regressionsrechnung innerhalb der Phase der konstanten Ausscheidung (4,0 bis 6,5 h nach Applikation; Intervallzeit t somit 2,5 h) ermittelt, wobei auf einem Signifikanzniveau von 0,001 ein Korrelationsfaktor von +0,990 vorlag.

$EP_{\#}$	$SEP_{\#}$	$ERP_{\#}$	$SERP_{\#}$
12,9 $\left[\frac{ng}{cm^2}\right]$	5,16 $\left[\frac{°\mu g}{cm^2}\right]$	4,0 $\left[\frac{ng}{cm^2 \cdot h}\right]$	1,60 $\left[\frac{°\mu g}{cm^2 \cdot h}\right]$

Kumulationszeit T = 8,0 h Intervallzeit t = 2,5 h

Ermittlung der Werte unter Iontophorese

II.4. Diskussion der Ergebnisse

II.4.a. Stromfreie Phase

In den ersten 3 h des Versuchs, als noch kein elektrisches Feld einwirkte, konnte mit dem RIBA keine Hirudin-Ausscheidung im Urin nachgewiesen werden (siehe Tab. 13, Seite 102).

Wertung:

Dieser Befund steht im Einklang mit den Ergebnissen der vorangegangenen Versuche (vgl. Tab. 11, Seite 95), in denen eine renale "lag-time" nach topischer Applikation von 36 - 60 h beobachtet wurde. Eine Hirudin-Ausscheidung im Harn konnte somit innerhalb der ersten drei Stunden der spontanen (ohne Strom) Absorption **nicht** erwartet werden.

Des korrekten Vergleiches wegen muß jedoch erwähnt werden, daß durch Anwendung des 100 µl-Direkteinsatzes sowie durch den Verzicht auf die Vorlage protektiver Substanzen in den Sammelgefäßen von einer geringeren Sensitivität des Nachweisverfahrens gegenüber den Versuchen zuvor ausgegangen werden muß.

II.4.b. Einwirkung des Gleichstromfeldes

Standardisierte Eliminationsraten $E_{stand.}$

Die Konzentration des Hirudins im Urin zeigt eine zeitliche Abhängigkeit:
Nach Anlegen des elektrischen Feldes steigt die Hirudin-Konzentration im Urin innerhalb von 1,5 h auf ein erstes Maximum von 52 ng Hirudin/ml Urin an und sinkt danach trotz unverändert einwirkenden Stromes nach 2,5 h nach Stromfluß-Beginn auf 8 ng/ml ab.
Ab diesem Zeitpunkt steigt die standardisierte Eliminationsrate wieder an und zwar über die 6. Versuchsstunde hinaus, obwohl zu diesem Zeitpunkt die Elektroden bereits entfernt wurden.
1 h nach Abschalten des Stromes wird ein zweites, geringfügig höheres, Maximum von 62 ng/ml erreicht.
Zu Versuchsende nach insgesamt 8 h (2 h nach Stromabschaltung) kehrt die Ausscheidung zu einem Wert von 9 ng/ml zurück, vergleichbar dem Wert zu Beginn und dem zwischenzeitlichen Maximum.

Wertung:

Ein ähnlich biphasisches Eliminationsverhalten konnte - ohne Einwirkung eines elektrischen Stromes - auch beim Schwein beobachtet werden (vgl. Abschnitt A.IV.1, Seite 64), wobei beim Schwein das erste Maximum der standardisierten Eliminationsrate nicht so deutlich ausfiel und der Rückgang der Ausscheidung aufgrund der Versuchsdauer von nur 6 h nicht erfaßt wurde.

Die Erklärung für diesen biphasischen Verlauf ist möglicherweise (wie beim Schwein bereits diskutiert) in der Shunt-Funktion der Hautanhangsgebilde zu suchen (siehe ZWEITER TEIL, Abschnitt B.III, Seite 39).

Rein spekulativ läßt sich aufgrund der starken Ausbildung des ersten Maximums der standardisierten Eliminationsrate vermuten, daß die Einwirkung des elektrischen Stromes nicht nur in der Spätphase des transepidermalen Stoffdurchtritts, sondern auch in der Frühphase der "Shunt-Diffusion" den perkutanen Stofftransport fördert.

Kumulative Elimination

Bereits 0,5 h nach Beginn des Stromflusses war im RIBA eine renale Hirudin-Ausscheidung meßbar. Im weiteren Verlauf der Stromeinwirkung und auch 0,5 h über deren Ende hinaus erwies sich die Elimination als konstant; erst danach wurde die Ausscheidung pro Zeiteinheit geringer, sodaß sich die Gesamt-Elimination 8 h nach Applikation asymptotisch dem Wert von ~ 25 µg näherte bei einer Gesamt-Auftragung auf die Haut von 12,5 mg Hirudin.

Wertung:

Mit 3-stündiger Iontophorese konnte innerhalb einer gesamten Versuchsdauer von 8 h (ab Auftragung der hirudinhaltigen Salbe) eine renale Elimination von 2 % der applizierten Hirudinmenge erreicht werden.

Dieser Wert liegt **um den Faktor 100 bzw. 200 höher** als bei spontaner Absorption ohne Strom (trotz dabei erheblich längerer Versuchszeiten; vgl. Seite 98).

Die Anwendung elektrischen Stromes nach topischer Applikation von Hirudin-Rohextrakt-Salbe bewirkt somit eine erhebliche quantitative Steigerung des perkutanen Hirudin-Durchtritts.

Anlaufzeit ("lag-time") der renalen Elimination

Wie bereits unter Abschnitt II.4.a (Seite 104) erwähnt, konnte bei spontaner (ohne Strom) Absorption erst nach 36 bzw. 60 h nach Auftragung der hirudinhaltigen Salbe Hirudin im Urin detektiert werden.

Unter Einwirkung elektrischen Gleichstromes über dem bestrichenen Hautareal konnte bereits 3,5 h nach Salbenapplikation eine renale Elimination des Hirudins festgestellt werden.

Wertung:

Durch Iontophorese wird die Verzögerungszeit ("lag-time", Anlaufzeit) der Ausscheidung topisch applizierten Hirudins im Harn gravierend reduziert. Das elektrische Feld fördert somit die perkutane Permeation von Hirudin nicht nur quantitativ (siehe oben), sondern beschleunigt auch deren Ingangkommen.

Permeationsparameter

Die quantitative und zeitliche Förderung der perkutanen Hirudin-Permeation durch Iontophorese wird auch durch den Vergleich der Permeationsparameter des Iontophorese-Versuchs mit denen der stromfreien Versuche dokumentiert:

Iontophorese-Versuch:

$EP_{\#}$	$SEP_{\#}$	$ERP_{\#}$	$SERP_{\#}$
12,9 $\left[\frac{ng}{cm^2}\right]$	5,16 $\left[\frac{°\mu g}{cm^2}\right]$	4,0 $\left[\frac{ng}{cm^2 \cdot h}\right]$	1,60 $\left[\frac{°\mu g}{cm^2 \cdot h}\right]$

Stromfreie Versuche: (vgl. Abschnitt D.I.3.c, Seite 97)

EP	SEP	ERP	SERP
0,14 $\left[\frac{ng}{cm^2}\right]$	0,056 $\left[\frac{°\mu g}{cm^2}\right]$	0,0038 $\left[\frac{ng}{cm^2 \cdot h}\right]$	0,0015 $\left[\frac{°\mu g}{cm^2 \cdot h}\right]$
0,33 $\left[\frac{ng}{cm^2}\right]$	0,132 $\left[\frac{°\mu g}{cm^2}\right]$	0,0046 $\left[\frac{ng}{cm^2 \cdot h}\right]$	0,0018 $\left[\frac{°\mu g}{cm^2 \cdot h}\right]$

Wertung:

Trotz nur halb so großer Flächenbeladung mit Wirkstoff (70 statt 140 mg Hirudin/cm² Haut) und erheblich kürzerer Kumulationszeit T konnten bei topischer Anwendung von Hirudin-Rohextrakt-Salbe unter Einwirkung eines elektrischen Gleichstromfeldes Permeationsparameter erzielt werden, die im Falle der **EP** um einen **Faktor bis zu ~ 90**, und im Falle der **ERP** um einen **Faktor bis zu ~ 1000** höher liegen als bei spontaner Absorption ohne Stromeinwirkung.

Entsprechendes gilt für die SEP bzw. die SERP.

*

E. HIRUDIN-NACHWEIS IN HAUTGEWEBSPROBEN NACH TOPISCHER APPLIKATION BEIM MENSCHEN

VERSUCHSZIEL

Aufgrund der positiven Ergebnisse der Absorptionsstudie mittels der methodisch einfacheren renalen Eliminationsmessung (Abschnitt D, Seite 92 ff) sollte der Nachweis der perkutanen Hirudin-Aufnahme beim Menschen auch durch die experimentell aufwendigere direkte Messung im Hautgewebe geführt werden.
Die Ergebnisse der analogen Versuche am Schwein (Abschnitt B, Seite 65 ff) zur Erforschung praktikabler Techniken ließen eine Versuchsdurchführung beim Menschen aussichtsreich erscheinen.
Zur Vermeidung eines unnötigen experimentellen Aufwandes wurde das Versuchsprocedere exemplarisch an einem Vorversuch (n = 1) und einer Versuchsreihe mit kleiner Fallzahl (n = 4) getestet, bevor die eigentliche Studie (n = 19) zur Durchführung kam.

I. VORVERSUCH

I.1. Experimentelle Durchführung

I.1.a. Proband

Es handelte sich um eine 40jährige Frau, Körpergewicht 52 kg, mit normalem mittleren Hautkolorit bei mittelblonder Haarfarbe, die sich aus kosmetischer Indikation dem Eingriff einer Bauchhautstraffung (Unterbauch + suprapubische Region) unterzog.

Zum Zeitpunkt der Operation lag keine Erkrankung vor.

I.1.b. Versuchsgestaltung

Salbenapplikation

Im Bereich des zu resezierenden doppelkeilförmigen Hautareals wurde sowohl auf der linken als auch auf der rechten Seite zu unterschiedlichen Zeiten hirudinhaltige Salbe appliziert. Um während der Einwirkzeiten kontinuierlich Salbenüberschuß zu gewährleisten und um außerdem unkontrolliertes Verstreichen der Salbe auf geplantermaßen applikationsfreie Areale zu vermeiden, wurde die Salbe mittels Kapselpflaster aufgebracht (siehe Abb. 34, Seite 108).

Zeit-Bedingungen

Um den Einfluß unterschiedlicher Einwirkzeiten zu untersuchen, wurden zwei identische mit hirudinhaltiger Salbe gefüllte Kapselpflaster zu verschiedenen Zeiten aufgeklebt: Das erste Kapselpflaster am Vorabend des Operationstages, das zweite am Vormittag des Operationstages (OP am Nachmittag) in einem Zentrumsabstand von 15 cm vom ersten Pflaster. Bis zur Gewebsexzision durch den Chirurgen entsprach dies in-vivo-Salbeneinwirkzeiten von 7,5 und 19,5 h.

Die sich unmittelbar anschließende Zeitspanne von 0 - 30 min bis zur Gewinnung der einzelnen Proben aus dem Exzidat wurde nicht berücksichtigt.

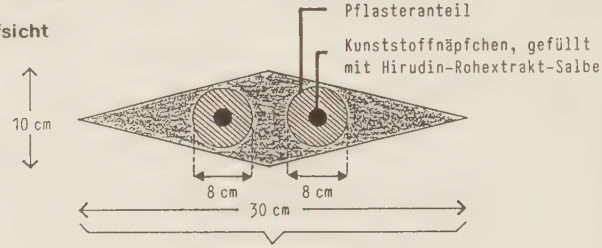
Nach Gewinnung wurden die Proben für die Dauer von 12 h in EPPENDORF-Tubes in flüssigem Stickstoff (Thermosgefäß) gelagert und anschließend bis zur Aufarbeitung und Testung im RIBA für 3 Monate bei -75°C tiefgefroren verwahrt.

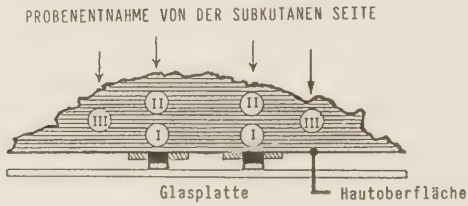
Gewebsgewinnung

Nach Resektion des Gewebes durch den Chirurgen wurde das Exzidat in toto mit der Oberfläche auf eine Glasplatte gelegt, wobei - zur Vermeidung von Kontamination der subkutanen Unterseite bzw. der applikationsfreien Stellen der epidermalen Oberseite mit Hirudin - sorgfältig darauf geachtet wurde, daß sich die Kapselpflaster nicht lösten. Sie verblieben auch während der Einzelprobengewinnung an ihren Applikationsstellen.

Die Gewinnung der 24 einzelnen Gewebsproben erfolgte an den mit I, II und III bezeichneten Stellen von subkutan unter strenger Wahrung der Unversehrtheit der Hautoberfläche (insbesondere bei I) mittels Skalpell und Pinzette. Die Verwendung von jeweils ungebrauchten Einmalinstrumenten bei jedem neuen Probensatz (á 3 Proben) war obligatorisch.

Abb. 34: **Präoperative Applikation von Hirudin-Rohextrakt-Salbe und Gewinnung von Hautgewebsproben aus einem Operations-Exzidat beim Menschen**





ENTNAHMEORTE FÜR DIE GEWEBSPROBEN:

I Einwirkzentrum, oberflächennah
II Einwirkzentrum, oberflächenfern
III Außerhalb des Einwirkzentrums

I.1.c. Verwendetes Applikat

In den Kapselpflastern befand sich Hirudin-Rohextrakt-Salbe der Firma PLANTORGAN in einer Sonderzubereitung der Charge HE 102 mit einer spezifischen Aktivität von **12500 ATE/°g Salbe** entsprechend einem Hirudingehalt von **0,625 mg Hirudin/°g Salbe.**

Die Kapselpflaster enthielten je 850 °mg Salbe, sodaß demnach ein Hirudin-Reservoir von **0,531 mg Hirudin/Pflaster** vorlag.

I.1.d. Nachweismethode

Die Gewebsproben wurden nach entsprechender Vorbereitung der Testung auf Hirudin im RIBA unterzogen (vgl. ERSTER TEIL, Abschnitt C.II.3, Seite 17 ff).

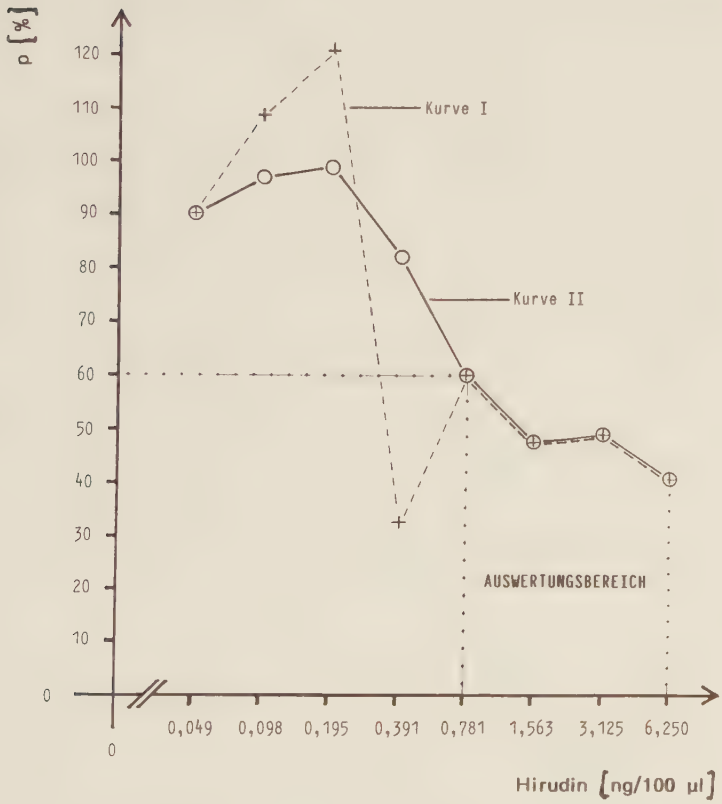
I.2. Ergebnisse

I.2.a. Probenadaptierte Standardkurve

Zur Auswertung der aus den Gewebsproben gewonnenen Meßdaten wurde eine probenadaptierte Standard-Eichkurve erstellt (siehe ERSTER TEIL, Abschnitt D.II, Seite 22). Das Gewebe hierzu stammte von derselben Patientin; es wurde in weitem Abstand (> 20 cm) von den u.U. hirudinhaltigen Proben in sicher applikationsfreiem Gebiet entnommen.

Abb. 35: **Probenadaptierte Standard-Eichkurve erstellt mit humanem Hautgewebe zur Ermittlung des Hirudingehaltes von Gewebsproben nach topischer Applikation von Hirudin-Rohextrakt-Salbe beim Menschen**

(Vorversuch mit Fallzahl n = 1)



Abszisse: Als Standard eingesetzte bzw. in Proben detektierte Hirudinmenge pro 100 µl Gewebeextrakt (siehe Seite 17-19 und 22)

Ordinate: Prozentuale Bindung p im RIBA (siehe Seite 7)

I.2.a. Die beiden Kurvenverläufe interpretieren dieselben Meßwerte, basieren aber auf unterschiedlichen Prämissen der Auswertung:

So wurden im Falle der Kurve I (+ - - - + - - - +) die zur Festlegung eines Kurvenpunktes herangezogenen RIBA-Bindungsraten der Dreifachbestimmungen ausnahmslos arithmetisch gemittelt; dagegen wurden im Falle der Kurve II (O——O——O) solche Bindungsraten bei der Mittelung nicht berücksichtigt, die zum einen aufgrund theoretischer Überlegungen zum RIBA und zum anderen aufgrund der Kenntnis weiterer Gewebe-Standardkurven (vgl. Seite 22, 24 und 25) als unwahrscheinlich gelten müssen. Der so entstandene Kurvenverlauf II zeigt die theoretisch zu erwartende charakteristische Form mit annähernd linearem mittelständigen Anteil. Im Bereich von ~ 0,8 - 6,2 ng Hirudin/100 µl verlaufen die Kurven I und II identisch.

Diesen Gegebenheiten trägt die nachfolgende Auswertung Rechnung, indem auf eine quantitative Bestimmung des Hirudingehaltes in den Proben verzichtet wurde und lediglich eine qualitative Klassifizierung der Proben erfolgte, deren Grenzziehung sich am verläßlichen Abschnitt des übereinstimmenden Verlaufs der Kurven I und II orientiert.

I.2.b. Meßwerte und Auswertung

Insgesamt wurden für jede der beiden Einwirkzeiten 12 Proben zu je 4 Gruppen á 3 Einzelproben (Proben 1-3; 4-6 & 7-9; 10-12) aus dem Exzidat entnommen. Auf das Entnahmeareal II entfielen dabei 2 Gruppen, die Entnahmeareale I und III waren durch jeweils eine Gruppe repräsentiert.

Die Entnahme von jeweils 3 Einzelproben aus der gleichen Region geschah aus statistischen Gründen im Sinne einer Dreifachbestimmung. Die Meßwerte sind zwar einzeln aufgelistet, zur Auswertung aber unter Elimination von out-of-limit-Werten gemittelt und entsprechend dem nachfolgend aufgeführten Schema gruppenweise klassifiziert:

Schema zur Klassifizierung der Gewebsproben nach ihrem Hirudingehalt:

$p \geq 100$ % entspricht Ø, d.h.: Mit der Meßmethode des RIBA ist unter den gegebenen experimentellen Bedingungen kein Hirudin nachweisbar.

$p \leq 60$ % entspricht +, d.h.: Hirudin ist mit Sicherheit in Mengen des Nanogramm-Bereiches vorhanden.

60 % < p < 100 % : Indifferenzbereich der unteren Nachweisgrenze; hier wird auf eine Bewertung verzichtet.

Legende zu Tab. 14 der folgenden Seite:

* Es handelt sich hier aus statistischer Sicht um out-of-limit-Werte, d.h. die Abweichung des Meßwertes vom Mittelwert der Dreifachbestimmung überschreitet die bei normalverteilten Meßwerten zulässige Abweichungsbreite.

** Extremer out-of-limit-Wert
Das negative Vorzeichen entsteht entsprechend der Formel zur Berechnung von p (siehe Seite 7) durch den Abzug der Grundaktivität N von einer sehr niedrigen Count-Zahl; diese bedeutet einen hohen Hirudingehalt der Probe.

() Die qualitative Klassifizierung erfolgt hier unter Vorbehalt, da für p ein out-of-limit-Wert vorliegt.

\# Es wurde keine Klassifizierung vorgenommen, da der Meßwert für p im Indifferenzbereich der unteren Nachweisgrenze liegt.

Tab. 14: **Meßwerte der RIBA-Testung humaner Hautgewebsproben auf Hirudin nach topischer Applikation von Hirudin-Rohextrakt-Salbe**

a) Kurze Salbeneinwirkzeit von 7,5 h

PROBEN-GRUPPE (Abb. 34, Seite 110)	Probe	Gewicht der Probe	Mittelwert des Probengewichtes	Prozentuale Bindung p der Probe im RIBA	Mittelwert der Bindungsraten	Qualitative Klassifizierung nach Schema	
Nr.	Nr.	[mg]	[mg]	[%]	[%]	Ø bzw. +	
I Zentrum, oberflächennah	1	129,8	114,7	168,4	161,8	Ø	Ø
	2	83,7		155,1		Ø	
	3	130,5		80,6 *		#	
II Zentrum, oberflächenfern	4	43,4	75,4	168,2	168,3	Ø	Ø
	5	125,0		168,4		Ø	
	6	57,8		122,3 *		(Ø)	
	7	38,1	78,3	150,2	146,7	Ø	Ø
	8	135,8		143,1		Ø	
	9	60,9		115,6 *		(Ø)	
III Außerhalb Zentrum	10	45,8	59,9	170,2	165,2	Ø	Ø
	11	40,8		242,1 *		(Ø)	
	12	93,1		160,2		Ø	

(Die Probenentnahme erfolgte stets von subkutan.)

b) Lange Salbeneinwirkzeit von 19,5 h

PROBEN-GRUPPE (Abb. 34, Seite 110)	Probe	Gewicht der Probe	Mittelwert des Probengewichtes	Prozentuale Bindung p der Probe im RIBA	Mittelwert der Bindungsraten	Qualitative Klassifizierung nach Schema	
Nr.	Nr.	[mg]	[mg]	[%]	[%]	Ø bzw. +	
I Zentrum, oberflächennah	1	189,1	167,3	59,4 *	22,9	(+)	+
	2	166,6		29,0		+	
	3	146,2		16,8		+	
II Zentrum, oberflächenfern	4	32,6	39,8	- 7,5 **	38,4	(+)	+
	5	38,6		21,9		+	
	6	48,2		54,9		+	
	7	60,3	64,5	21,5	22,8	+	+
	8	50,4		4,8 *		(+)	
	9	82,9		24,1		+	
III Außerhalb Zentrum	10	64,2	78,9	132,6	134,6	Ø	Ø
	11	76,8		136,6		Ø	
	12	95,8		91,1 *		#	

I.3. Diskussion und Beurteilung der Ergebnisse

Hoher Fettgehalt des Gewebes

Das Auftreten hoher Varianzen bei der RIBA-Testung von Gewebsproben wurde bereits im ERSTEN TEIL, Abschnitt E (Seite 23 - 26) beschrieben. Dort (Seite 26) wurde ein hoher Fettgehalt des Gewebes, der durch die Probenaufarbeitung nur teilweise eliminiert wird, als wesentlicher Störfaktor des RIBA genannt. Aufgrund der Operationsindikation lag der Störfaktor >hoher Fettgehalt< bei den gewonnenen humanen Gewebsproben in besonderer Ausprägung vor.
Sehr wahrscheinlich ist dadurch auch die konsequente Verschiebung der Bindungsraten p in Richtung hoher Prozentwerte (bis zu 170,2 %, bei out-of-limit-Werten bis zu 242,1 %), wie sie theoretisch beim RIBA überhaupt nicht vorkommen dürften, zu erklären.

Out-of-limit-Meßwerte

Die Out-of-limit-Meßwerte zeigen trotz ihrer Lage außerhalb des statistisch zulässigen Streubereichs ein gruppenkonformes Verhalten:
Klassifiziert man sie (mit Ausnahme der im Indifferenz-Bereich liegenden Werte) als Einzelmessung nach bekanntem Schema (siehe Seite 110), so liefern sie die gleiche qualitative Aussage wie die zur Mittelwertbildung herangezogenen übrigen Werte ihrer Dreiergruppe.

Salbeneinwirkzeit/Zeitfaktor

Mit dem RIBA konnte nach 19,5 h Hirudin in den humanen Gewebsproben nachgewiesen werden. Es ist anzunehmen, daß kleinere Hirudinmengen, die mit dem RIBA nicht erfaßt werden, auch schon in kürzerer Zeit vom epikutanen Depot in tiefere Hautschichten penetriert sein können.
Zur Bedeutung des Zeitfaktors siehe auch Abschnitt E.III, Seite 119 ff.

I.4. Zusammenfassende Beurteilung

Die Meßergebnisse erlauben folgende Aussagen:

(1) Im Falle der "kurzen" Salbeneinwirkzeit von 7,5 h läßt sich mit der Meßmethode des RIBA in **keinem** der drei Entnahmeareale Hirudin nachweisen:
8 von 12 Proben ≙ 66,7 % : Nachweis negativ
3 von 12 Proben ≙ 25,0 % : Nachweis bedingt negativ
1 von 12 Proben ≙ 8,3 % : Im Indifferenzbereich

(2) Im Falle der "langen" Salbeneinwirkzeit von 19,5 h muß unterschieden werden, aus welchem Areal die Gewebsproben entnommen wurden:

Entnahmeareal I: Bei 2 von 3 Proben ≙ 66,7 % positiver Nachweis
Bei 1 von 3 Proben ≙ 33,3 % bedingt pos. Nachw.

Entnahmeareal II: Bei 4 von 6 Proben ≙ 66,7 % positiver Nachweis
Bei 2 von 6 Proben ≙ 33,3 % bedingt pos. Nachw.

Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den gemittelten RIBA-Bindungsraten für oberflächennah (Areal I: $\overline{p}$ = 22,9 %) und oberflächenfern (Areal II: $\overline{p}$ = 38,4 bzw. 22,8 %) unterhalb des Applikationszentrums gewonnene Proben.

Entnahmeareal III: Bei 2 von 3 Proben ≙ 66,7 % negativer Nachweis
1 von 3 Proben ≙ 33,3 % im Indifferenz-Ber.

Bei Probenentnahme außerhalb des Applikationszentrums (mindestens 10 cm vom Einwirkzentrum entfernt) läßt sich mit dem RIBA weder bei "kurzer" (siehe oben) noch bei "langer" Salbeneinwirkzeit Hirudin im Gewebe nachweisen.

Insgesamt ist damit klar erwiesen, daß Hirudin nach topischer Applikation in Salbenform die menschliche Haut permeieren kann und nach 19,5 h mit einer empfindlichen Methodik in biologisch aktiver Form im Hautgewebe (Korium und Subkutangewebe) nachweisbar ist.

II. KLEINSERIE MIT FALLZAHL N = 4

Da der exemplarische Vorversuch positive Ergebnisse lieferte, sollte in einer Versuchsreihe mit kleiner Fallzahl das experimentelle Procedere modifiziert und für den Einsatz in einer umfangreicheren Studie erprobt werden.

II.1. Experimentelle Durchführung

II.1.a. Probanden

Bei den Personen, die für die Applikation von Hirudin-Rohextrakt-Salbe und die anschließende Gewinnung von Hautgewebsproben zur Verfügung standen, handelte es sich um chirurgische Patienten, die sich einem operativen Eingriff im Handbereich unterziehen mußten.

Die folgende Tabelle gibt die individuellen Daten der Patienten wieder.

Tab. 15: Individualdaten der Probanden der klinischen Studie >in kleiner Fallzahl< zur perkutanen Absorption von Hirudin-Rohextrakt-Salbe

PA-TIENT	Ge-schlecht	Alter	Körper-gewicht	Körper-größe	Operations-indikation	Applikations-areal
Nr.	m/w	[a]	[kg]	[cm]		
I	w	56	80	164	Karpaltunnel-Syndrom links	Thenar der linken Hand
II	w	45	58	158	Karpaltunnel-Syndrom rechts, erstes Rezidiv	Thenar der rechten Hand
III	w	36	48	153	Karpaltunnel-Syndrom rechts	Thenar der rechten Hand
IV	m	63	62	171	DUPUYTRENsche Kontraktur D 3/4 links	Hohlhand links

Außer den Operationsindikationen lagen bei den genannten Personen keine Erkrankungen vor.

II.1.b. Versuchsgestaltung

Salbenapplikation

Am Tag vor der Operation wurde im Bereich des geplanten Eingriffes hirudinhaltige Blutegel-Rohextrakt-Salbe der jeweils angegebenen Konzentration und Menge mit einem Spatel leicht massierend auf eine Fläche von 5 cm x 5 cm = 25 cm^2 aufgetragen und dieses Areal mittels TEGADERM-Klebefolie okklusiv abgedeckt.

Die im Vorversuch verwendeten Kapselpflaster konnten hier aufgrund der anatomischen Gegebenheiten, d.h. wegen der starken Krümmung der Applikationsflächen, nicht verwendet werden.

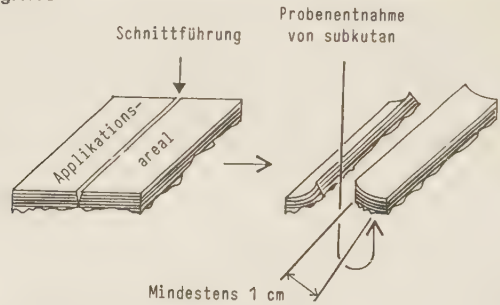
Gewebsgewinnung

Unmittelbar vor Beginn der Operation (am Tag nach der Salbenapplikation) wurde die TEGADERM-Klebefolie abgenommen. Nach Entfernung des verbliebenen Überschusses an Salbe erfolgte die routinemäßige Operationsvorbereitung durch dreistufige Reinigung und Desinfektion der Eingriffsfläche mit FREKA-Seifenlösung, Äther und KODAN-Lösung (vgl. hierzu DRITTER TEIL, Abschnitt B.II.3, Seite 67 ff).

Die Zeitspanne zwischen diesen vorbereitenden Maßnahmen und der definitiven Probenentnahme betrug je nach Ablauf zwischen 30 und 45 min. Sie wurde der okklusiven Salbeneinwirkzeit ab Salbenapplikation bis zum Beginn der Operationsvorbereitung nicht hinzugerechnet.

Die Probenentnahme selbst erfolgte in Analogie zum Vorgehen beim Schweine-Versuch (Seite 67/68 und 72/73) und beim Vorversuch (Seite 108) von subkutan ohne Penetration bzw. Schädigung der obersten Hautschicht sofort nach Durchführung des Hautschnittes. Es wurde ein Sicherheitsabstand (um eine Kontamination mit oberflächlich anhaftendem Hirudin auszuschließen) von mindestens 1 cm von der Schnittlinie eingehalten. Zur Gewebsentnahme dienten bis dahin ungebrauchte Instrumente.

Abb. 36: **Vorgehen bei der Hautgewebsgewinnung im Rahmen chirurgischer Eingriffe**



Histologisch betrachtet bestanden die entnommenen Gewebsteile aus Subkutis, Korium und subkornealen Anteilen der Epidermis.

Zeit-Bedingungen

Nach Entnahme mittels Skalpell und Pinzette wurden die Gewebspartikel in EPPENDORF-Tubes verbracht, ihr Feuchtgewicht durch Differenzwägung bestimmt, sodann wurden die Tubes bis zum Abschluß der Operation in flüssigem Stickstoff verwahrt und anschließend bis zur Aufarbeitung für den RIBA bei -75°C tiefgefroren gelagert (1 - 7 Tage).

Die Zeiten okklusiver Salbeneinwirkung (ab Beginn der Applikation bis zum Beginn der OP-Vorbereitungen) sind in Tab. 16 (Seite 116) angegeben.

II.1.c. Verwendetes Applikat

Es gelangte eine von der Firma PLANTORGAN zur Verfügung gestellte hirudinhaltige Blutegel-Rohextrakt-Salbe (Charge vom 11.01.84) mit einer garantierten spezifischen Aktivität von **50000 ATE/°g Salbe** entsprechend einem Hirudingehalt von **2,5 mg Hirudin/°g Salbe** zur Anwendung.

II.1.d. Nachweismethode

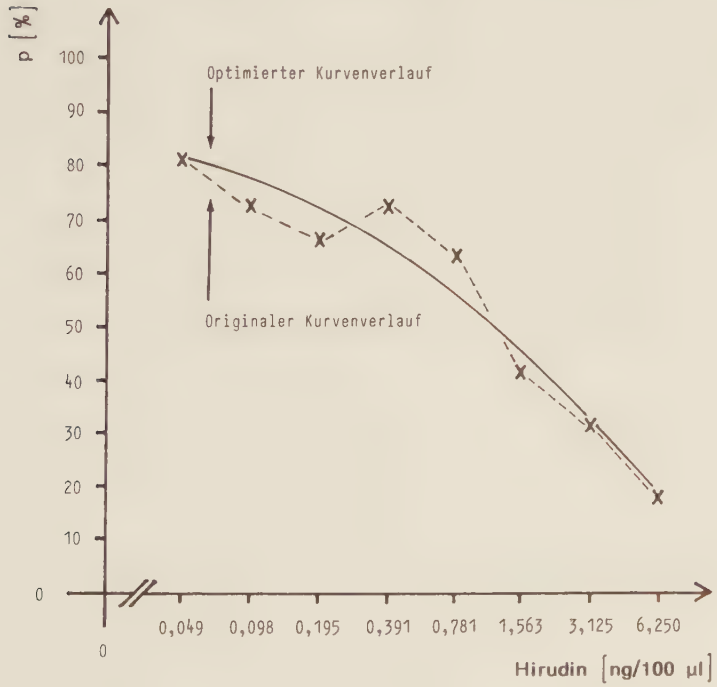
Die Testung der Gewebsproben auf Hirudin erfolgte wie im Vorversuch angegeben mittels RIBA nach entsprechender Probenvorbereitung (vgl. ERSTER TEIL, Abschnitt C.II.3, Seite 17 ff).

II.2. Ergebnisse

II.2.a. Probenadaptierte Standardkurve

Zur Auswertung der mit den Extrakten der Gewebsproben gemessenen RIBA-Bindungsraten wurde wie im Vorversuch eine probenadaptierte Standard-Eichkurve mit Humangewebe erstellt.
Ihr Verlauf unterscheidet sich von den bisher gezeigten Standardkurven insofern, als der sigmoide Anteil im Bereich der oberen und unteren Nachweisgrenze fehlt und lediglich der annähernd lineare mittelständige Anteil zur Darstellung kommt.
Da der originale Kurvenverlauf (x - - - x - - - x) im unteren bis mittleren Meßbereich (~ 0,05 - 0,8 ng Hirudin/100 µl) wiederum ausgeprägte Varianzen zeigt, wurde analog zum Vorversuch auf eine quantitative Auswertung verzichtet. Der in Abb. 37 abgebildete **optimierte Kurvenverlauf** (————) bildet die Grundlage für die qualitative Klassifizierung nach dem auf Seite 116 definierten Schema.

Abb. 37: **Probenadaptierte Standard-Eichkurve erstellt mit humanem Hautgewebe zur Ermittlung des Hirudingehaltes von Gewebsproben nach topischer Applikation von Hirudin-Rohextrakt-Salbe**
(Klinische Studie >in kleiner Fallzahl< mit n = 4)



Abszisse: Als Standard eingesetzte bzw. in Proben detektierte Hirudinmenge pro 100 µl Gewebeextrakt (siehe Seite 17-19 und 22)

Ordinate: Prozentuale Bindung p im RIBA (siehe Seite 7)

II.2.b. Meßwerte und Auswertung

Operationsbedingt konnten zwischen 2 und 4 Gewebsproben pro Patient gewonnen werden.

Die qualitative Beurteilung der Meßwerte über die Standard-Eichkurve orientierte sich an folgendem Schema:

p > 80 % entspricht ∅, d.h.: Mit der Meßmethode des RIBA ist unter den gegebenen experimentellen Bedingungen kein Hirudin nachweisbar.

p ≤ 80 % entspricht +, d.h.: Hirudin ist mit Sicherheit in Mengen des Nanogramm-Bereiches nachweisbar.

Aufgrund des Verlaufes der Standardkurve konnte auf die Definition eines Indifferenzbereiches verzichtet werden.

Tab. 16: **Meßwerte der RIBA-Testung humaner Hautgewebsproben auf Hirudin nach topischer Applikation von Hirudin-Rohextrakt-Salbe**

(Klinische Studie >in kleiner Fallzahl< mit n = 4)

PATIENT Entnahmeregion	Probe	Salbeneinwirkzeit	Gesamtmenge applizierten Hirudins	Gewicht der Probe	Mittelwert des Probengewichtes	Prozentuale Bindung p der Probe im RIBA	Mittelwert der Bindungsraten	Qualitative Klassifizierung nach Schema
	Nr.	[h]	[mg]	[mg]	[mg]	[%]	[%]	∅ bzw +
I Thenar	1	16,9	2,40	39,1	37,1	14,1 *	-------	(+)
	2			20,6		87,2		∅
	3			51,5		74,9		+
II Thenar	4	17,4	1,90	18,5	20,0	122,3	-------	∅
	5			21,4		32,2		+
III Thenar	6	18,0	1,33	27,3	26,3	78,5 *	4,5	(+)
	7			23,5		1,6		+
	8			28,1		7,4		+
IV Hohlhand	9	21,0	1,68	24,7	22,0	85,2 *	113,0	(∅)
	10			13,9		120,2		∅
	11			21,5		115,6		∅
	12			28,0		103,3		∅

Die Symbolbedeutung ist die gleiche wie im Vorversuch (siehe Seite 110):

* Out-of-limit-Wert

() Klassifizierung unter Vorbehalt, da out-of-limit-Wert

Bei den Patienten I und II wurde wegen der erheblichen Varianz der Einzelmeßwerte auf eine gruppenweise Klassifizierung verzichtet.

II.3. Diskussion und Beurteilung der Ergebnisse

Out-of-limit-Meßwerte

Abgesehen vom Meßwert der Probe Nr. 1 der Patientin I (hier wurde keine gruppenweise Klassifizierung durchgeführt) zeigen die out-of-limit-Werte wie beim Vorversuch bei der qualitativen Klassifizierung ein gruppenkonformes Verhalten (siehe hierzu Seite 112).

Salbeneinwirkzeit

In Kenntnis der Ergebnisse des Vorversuchs (Seite 112) wurden nur Proben nach "langer" Salbeneinwirkzeit gewonnen. Sie betrug im Mittel 18,0 h.
Aufgrund der Inhomogenität der übrigen experimentellen Bedingungen bei den einzelnen Patienten (unterschiedliche Entnahmeregion, verschiedene Hirudin-Applikationsmengen, unterschiedliches Geschlecht) ist eine Bewertung hinsichtlich der Unterschiede (max. 3,5 h) der einzelnen Salbeneinwirkzeiten nicht sinnvoll.

Gewebecharakteristik

Aufgrund der im Vergleich zum Vorversuch sehr verschiedenen Operationsindikationen war die RIBA-Testung der Gewebsproben in der vorliegenden Versuchsreihe **nicht** durch einen übermäßig hohen Fettgehalt belastet.
Inwieweit die Operationsindikationen selbst einen Einfluß auf die Hautpermeabilität besitzen, kann anhand der durchgeführten Versuche nicht entschieden werden, da aus einleuchtenden Gründen eine Kontrollgruppe (Probenentnahme am gesunden Probanden) nicht existiert. Es gilt auf jeden Fall festzuhalten, daß es sich beim Karpaltunnel-Syndrom (Patientinnen I, II und III) sowie bei der DUPUYTRENschen Kontraktur (Patient IV) um chronisch-entzündliche, proliferierende Erkrankungen im Bereich des Bindegewebes handelt, die möglicherweise auch die darüberliegende Haut in ihrer absorptiven Potenz verändern (siehe hierzu ALLGÖWER [101]).
Darüberhinaus ist die Entnahmeregion für die Permeabilität der Haut von wesentlicher Bedeutung: So ist die Beschwielung (Stratum corneum) im Hohlhandbereich wesentlich dicker als z.B. im Thenar-Bereich (vgl. Abb. 16, Seite 34).
Ferner ist der Geschlechtsunterschied in Rechnung zu stellen: Bei Patient IV handelt es sich um einen Mann, während die übrigen Patienten I - III weiblichen Geschlechts sind. Physiologischerweise sowie tätigkeitsbedingt weisen Männer im allgemeinen eine stärkere Hohlhandbeschwielung auf als Frauen; zudem existieren geschlechtsspezifische Unterschiede der perkutanen Permeabilität (vgl. Seite 56).

Andererseits darf das negative Resultat des Patienten IV nicht isoliert betrachtet und nicht überbewertet werden: In der erweiterten klinischen Studie (siehe Seite 119 ff) finden sich Patienten mit analogen Bedingungen (Geschlecht männlich; Entnahmeregion Hohlhand), bei denen ein positiver Hirudin-Nachweis geführt werden konnte.
Erhebliche inter-individuelle Schwankungen der perkutanen Permeabilität sind daher nicht auszuschließen.

Vergleich mit den analogen Versuchen am Schwein

Während beim Schwein eine Flächenbeladung von 0,89 mg Hirudin/m² Haut vorlag (Feld F, Tab. 3, Seite 66), betrug die Hirudin-Auftragung in den Human-Versuchen das 380- bis 1000fache davon, nämlich 336 - 960 mg/m².

Ferner konnte im Schweine-Versuch die aufgetragene Salbe lediglich wenige Minuten (2 - 5 min; vgl. Seite 68 und 73) einwirken, während bei den Human-Versuchen Salbeneinwirkzeiten von 16,9 - 21,0 h (vgl. Seite 116) gegeben waren.

II.3. Trotz dieser unterschiedlichen Voraussetzungen lagen die pro Hautgewebsprobe (Probengewicht beim Schwein 35 - 46 mg, beim Menschen 14 - 52 mg) gemessenen RIBA-Bindungsraten sowohl beim Schwein als auch beim Menschen in der gleichen Größenordnung, die Hirudinmengen des Nanogramm-Bereichs von ~ 0,05 bis 6,3 ng repräsentiert.

Dies steht im Einklang mit der bereits bei den Eliminationsmessungen gemachten Beobachtung, daß das Schwein eine deutlich höhere Permeabilität der Haut für Hirudin aufweist als der Mensch (siehe Seite 98).

II.4. Zusammenfassende Beurteilung

Ungeachtet differenzierter Bewertungen, wie sie oben ausgeführt wurden, lassen sich die Ergebnisse wie folgt zusammenfassen:

Tab. 17: **Hirudin-Nachweis in humanen Hautgewebsproben nach topischer Applikation von Hirudin-Rohextrakt-Salbe**

(Klinische Studie >in kleiner Fallzahl< mit n = 4)

	Von weiblichen Patienten		Von männlichen Patienten	
	absolut	relativ	absolut	relativ
GESAMTZAHL an Gewebsproben	8	100 %	4	100 %
Gewebsproben mit positivem Hirudin-Nachweis im RIBA	6	75 %	0	0 %
davon bedingt pos.	2	25 %	-	----
Gewebsproben mit negativem Hirudin-Nachweis im RIBA	2	25 %	4	100 %
davon bedingt neg.	0	0 %	1	25 %

Wie beim Vorversuch (Seite 112) ließ sich nach topischer Applikation von Hirudin-Rohextrakt-Salbe bei langer Salbeneinwirkzeit (im Durchschnitt 18,0 h) in den getesteten Gewebsproben Hirudin im Nanogramm-Bereich mittels des RIBA nachweisen.

Eine erweiterte klinische Studie mit größerer Fallzahl zur Beurteilung der Bedeutung von Salbeneinwirkzeit und Hirudin-Konzentration in der Salbe erschien daher gerechtfertigt.

*

III. ERWEITERTE STUDIE MIT FALLZAHL N = 19

In einer erweiterten klinischen Studie sollte die perkutane Absorption von Hirudin aus Rohextrakt-Salbe in vivo durch eine größere Fallzahl belegt werden; außerdem sollte der Einfluß der Hirudin-Konzentration in der Salbe untersucht werden.

Das in der vorangegangenen Versuchsreihe (n = 4) erprobte experimentelle Procedere hatte sich dafür als praktikabel erwiesen.

III.1. Experimentelle Durchführung

III.1.a. Probanden

Analog wie bei der Kleinserie (Seite 113 - 118) handelte es sich bei den Versuchspersonen um chirurgische Patienten, die sich einem operativen Eingriff im Handbereich unterziehen mußten.

Tab. 18 (Anhang, Seite XI/XII) gibt die individuellen Daten der Patienten wieder.

III.1.b. Versuchsgestaltung

Bezüglich Salbenapplikation, Gewebsgewinnung und Zeit-Bedingungen kann auf die Ausführungen unter Abschnitt E.II.1.b (Seite 113/114) verwiesen werden, da in gleicher Weise vorgegangen wurde.

III.1.c. Verwendetes Applikat

Um die Bedeutung der Hirudinkonzentration in der applizierten Salbe zu untersuchen, wurden 3 Konzentrationsgruppen gebildet:

GRUPPE A: **10000 ATE/°g Salbe** entsprechend 0,5 **mg Hirudin/°g Salbe**

GRUPPE B: **25000 ATE/°g Salbe** entsprechend 1,25 **mg Hirudin/°g Salbe**

GRUPPE C: **50000 ATE/°g Salbe** entsprechend 2,5 **mg Hirudin/°g Salbe**

Die Salbenpräparationen wurden von der Firma PLANTORGAN zur Verfügung gestellt und entstammten ohne Ausnahme der Charge 42 002 vom 20.02.1984.

III.1.d. Nachweismethode

Die Testung der Gewebsproben auf Hirudin erfolgte in bekannter Weise mittels RIBA nach entsprechender Probenvorbereitung (siehe ERSTER TEIL, Abschnitt C.II.3, Seite 17 ff).

III.2. Ergebnisse

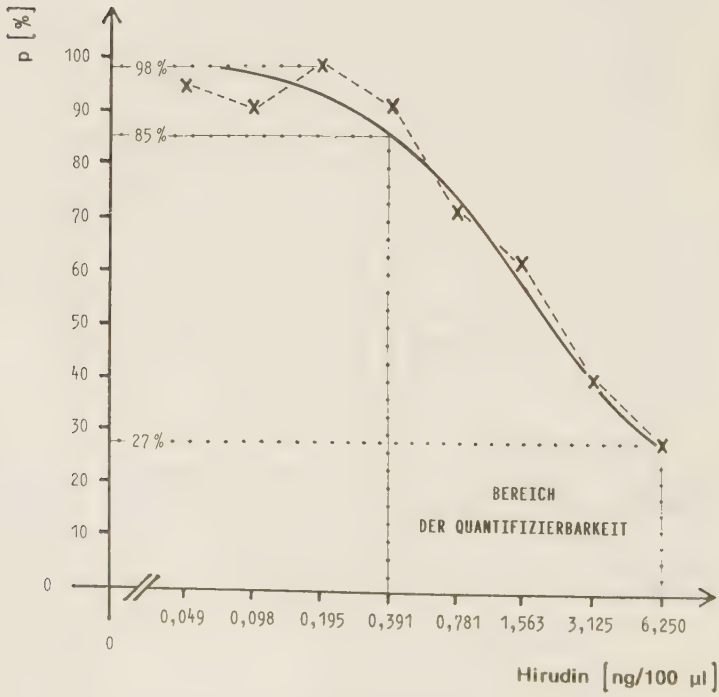
III.2.a. Probenadaptierte Standardkurve

Wegen der einfacheren Materialgewinnung wurde die Standard-Eichkurve mit Gewebe vom Schwein erstellt (siehe hierzu ERSTER TEIL, Abschnitt C.II.3.b, Seite 17).

Jeder Kurvenpunkt des originalen Kurvenverlaufs (**x - - - x - - - x**) repräsentiert den Mittelwert einer Dreifachbestimmung. Zur Auswertung der Proben wurde der **optimierte Kurvenverlauf** (————————) herangezogen, wobei wegen der erhöhten Varianz im Bereich niedriger Hirudinkonzentrationen die **Quantifizierung** der Meßwerte auf den **Bereich von ~ 0,4 bis ~ 6,2 ng Hirudin/100 µl** (entsprechend einem Bereich der prozentualen Bindung p im RIBA von 27 - 85 %) beschränkt wurde.

Abb. 38: **Probenadaptierte Standard-Eichkurve, erstellt mit Hautgewebe vom Schwein, zur Ermittlung des Hirudingehaltes humaner Hautgewebsproben nach topischer Applikation von Hirudin-Rohextrakt-Salbe**

(Erweiterte klinische Studie mit Fallzahl n = 19)



Abszisse: Als Standard eingesetzte bzw. in Proben detektierte Hirudinmenge pro 100 µl Gewebeextrakt (siehe Seite 17-19 und 22)

Ordinate: Prozentuale Bindung p im RIBA (siehe Seite 7)

III.2.b. Prämissen der Auswertung

Im Gegensatz zu den vorausgegangen Versuchen bestand nun das Versuchsziel nicht nur in einem qualitativen Hirudin-Nachweis, sondern es sollten die Einflüsse der Hirudin-Konzentration in der Salbe und der Salbeneinwirkzeit differenziert untersucht werden.

Aus diesem Grund wurde soweit möglich eine Quantifizierung der Meßwerte angestrebt; ferner erfolgte die Bewertung jeder Probe einzeln ohne gruppenweise Mittelwertbildung.

Im nahezu linearen Anteil der Standardkurve (27 % ≤ p ≤ 85 %) konnte die Auswertung quantitativ vollzogen werden. Meßwerte, die außerhalb dieses Bereiches lagen, wurden grobquantitativ mit > bzw. < Angaben qualifiziert. Unter zusätzlicher Berücksichtigung des jeweiligen Probengewichtes, das operationsbedingt zwischen 11,5 und 138,1 mg schwankte, wurde letztendlich eine **semi-quantitative Auswertung** durchgeführt, die folgendes Klassifizierungsschema zur Grundlage hatte:

Klassifizierungsschema zur semi-quantitativen Auswertung der RIBA-Bindungsraten humaner Hautgewebsproben nach topischer Anwendung von Hirudin-Rohextrakt-Salbe:

Prozentuale Bindung p im RIBA	Hirudin-Gesamtgehalt der Probe	Numerische Quantifizierbarkeit	Gewebekonzentration der Probe an Hirudin	Semi-quantitative Klassifizierung
	[ng]		[pg Hirudin / mg Gewebe]	Ø / + / ++ / +++
98 % ≦ p	nicht nachweisbar	----------	----------	Ø
85 % < p < 98 %	unter 0,4	nicht möglich	unter 50	+
27 % ≦ p ≦ 85 %	0,4 bis 6,2	möglich	unter 50 zwischen 50 und 100 über 100	+ ++ +++
p < 27 %	über 6,2	nicht möglich	unter 50 über 50, aber nicht sicher über 100 sicher über 100	+ ++ +++

III.2.c. Meßwerte und Auswertung

Insgesamt konnten von den 19 Patienten 56 Gewebsproben (in der Regel 3 Proben pro Patient) gewonnen werden.

Die ermittelten Meßdaten sowie die semi-quantitativen Klassifizierungen sind in Tab. 19 (Anhang, Seite XIII und XIV) zusammengefaßt. Innerhalb der Konzentrationsgruppen A, B und C sind die Patienten nach steigender Salbeneinwirkzeit aufgelistet.

Die Auswertung der klassifizierten Meßergebnisse geschah unter folgenden zwei Aspekten:

① Bedeutung der Salbenkonzentration

Tab. 20: Häufigkeitsverteilung des semi-quantitativ klassifizierten Hirudingehaltes von humanen Hautgewebsproben nach topischer Applikation von Blutegel-Rohextrakt-Salbe in 3 verschiedenen Konzentrationen

		GRUPPE A	GRUPPE B	GRUPPE C
Salbenkonzentration [ATE/°g]		10 000	25 000	50 000
Gesamtzahl z an Proben		12 (100 %)	14 (100 %)	30 (100 %)
Anzahl der Proben mit negativem Ergebnis im RIBA		0 (0 %)	0 (0 %)	14 (46,7 %)
Anzahl der Proben mit positivem Ergebnis im RIBA		12 (100 %)	14 (100 %)	16 (53,3 %)
davon:	einfach-positiv	7 (58,3 %)	3 (21,4 %)	10 (33,3 %)
	zweifach-positiv	1 (8,4 %)	0 (0 %)	1 (3,3 %)
	dreifach-positiv	4 (33,3 %)	11 (78,6 %)	5 (16,7 %)

Um die gewonnenen Daten einer statistischen Auswertung unterziehen zu können, wurden die Klassifizierungsmerkmale Ø, +, ++ und +++ numerisch in eine Ordinal- oder Rangskala (siehe BAMBERG & BAUR[102]) umgeschrieben:
Ø entspricht 0 + entspricht 1 ++ entspricht 2 +++ entspricht 3

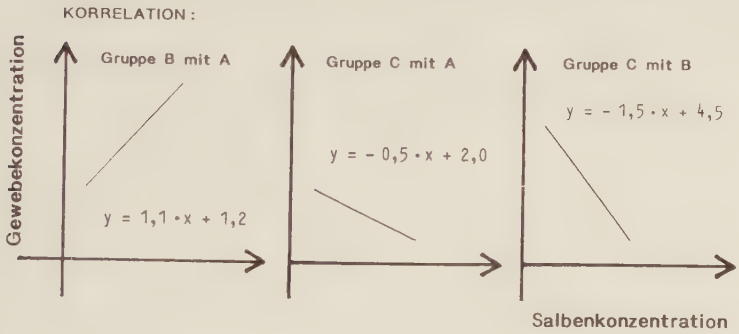
Nach Festlegung der **Irrtumswahrscheinlichkeit zu 5 %** ergab die statistische Prüfung der Gruppen gegeneinander im t-Test für ungepaarte Gruppen folgende Werte:

Tab. 21: Ergebnisse des Gruppenvergleichs im t-Test

GRUPPENVERGLEICH	B gegen A		C gegen A		C gegen B	
Probenzahl z der Gruppe	14	12	30	12	30	14
Mittelwert des klassifizierten Hirudingehaltes	2,571	1,750	0,900	1,750	0,900	2,571
Standardabweichung	0,852	0,965	1,094	0,965	1,094	0,852
Assoziationsmaß	0,426		0,348		0,614	
t-Wert	- 2,31		+ 2,35		+ 5,04	
SIGNIFIKANZNIVEAU	0,030		0,024		0,001	

III.2.c. Unter Anwendung der linearen Regression auf den Vergleich der Gruppen B gegen A, C gegen A und C gegen B ergibt sich folgendes Bild:

Abb. 39: **Regressionsgeraden der Korrelation zwischen Hirudinkonzentration der Salbe und Hirudingehalt der Gewebsproben**



Korrelations-koeffizient:	+ 0,426	- 0,409	- 0,703
Signifikanz-niveau:	0,030	0,009	0,001

Fazit:

(Alle Aussagen beziehen sich auf die a priori festgelgte Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %.)

1. Der in der **Gruppe B** (1,25 mg Hirudin/°g Salbe) durchschnittlich höhere Hirudingehalt der Proben **im Vergleich zur Gruppe A** (0,5 mg Hirudin/°g Salbe) ist mit einem Signifikanzniveau von 0,030 (< 0,05) statistisch signifikant.
   Es besteht auf gleichem signifikanten Niveau (0,030) eine Korrelation von + 0,426 zwischen Hirudinkonzentration der aufgetragenen Salbe (bei stets gleicher Applikationsmenge) und durchschnittlich gemessenem Hirudingehalt der Proben.

2. Der in der **Gruppe C** (2,5 mg Hirudin/°g Salbe) durchschnittlich niedrigere Hirudingehalt der Proben **im Vergleich zur Gruppe A** (0,5 mg Hirudin/°g Salbe) ist ebenfalls statistisch signifikant mit einem Signifikanzniveau von 0,024 (< 0,05).
   Es besteht hier auf einem signifikanten Niveau von 0,009 (< 0,05) eine Korrelation von - 0,409 zwischen Salbenkonzentration und Probengehalt an Hirudin.

3. In Konsequenz zu 1. und 2. zeigt die **Gruppe C auch im Vergleich zur Gruppe B** einen durchschnittlich niedrigeren Hirudingehalt der Proben. Auch dieses Ergebnis ist signifikant mit einem Niveau von 0,001 (< 0,05).
   Die Korrelation zwischen Salbenkonzentration und Hirudingehalt der Proben beträgt hier - 0,703 auf einem Niveau von ebenfalls 0,001.

② Bedeutung der Salbeneinwirkzeit

Die Beeinflußbarkeit des Hirudingehaltes in den Gewebsproben durch die Salbeneinwirkzeit wurde für jede der verwendeten Salbenkonzentrationen gruppenweise (Gruppen A, B und C) geprüft.

Analog zur vorausgehenden Auswertung wurden die Klassifizierungsmerkmale Ø, +, ++ und +++ wiederum in eine numerische Rangskala umgeschrieben (siehe Seite 122).
Die Varianzanalyse wurde 4- bzw. 5-stufig durchgeführt:
Dabei entsprachen in den Konzentrationsgruppen A und B die vier bzw. fünf verschiedenen Einwirkzeiten bei den einzelnen Patienten den Stufen der unabhängigen Variablen >Salbeneinwirkzeit<. Im Falle der Gruppe C wurden die Einwirkzeiten wie folgt in fünf Stufen eingeteilt:

Stufe 1: 16,7 h (Proben 27 - 29)
Stufe 2: 17,5 h (Proben 30 - 35)
Stufe 3: 19,0 - 19,5 h (Proben 36 - 44)
Stufe 4: 20,0 - 20,8 h (Proben 45 - 53)
Stufe 5: 25,6 h (Proben 54 - 56)

Folgende Ergebnisse konnten gewonnen werden:

Tab. 22: Statistische Beurteilung der Bedeutung der Salbeneinwirkzeit auf den Hirudingehalt humaner Hautgewebsproben

KONZENTRATIONSGRUPPE	A	B	C
Probenzahl z der Gruppe	12	14	30
Bereich der Salbeneinwirkzeiten [h]	17,0 - 22,0	18,2 - 19,6	16,7 - 25,6
Salbeneinwirkzeit im Mittel [h]	19,4	18,8	19,4
EINFACHE VARIANZANALYSE			
Signifikanzniveau	0,003	0,228	0,002
KORRELATIONSRECHNUNG			
Korrelationskoeffizient	+ 0,582	- 0,108	+ 0,627
Signifikanzniveau	0,047	0,714	0,001

Fazit:

(Alle Aussagen beziehen sich wiederum auf die a priori festgelegte Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %.)

1. In der **Gruppe A** (0,5 mg Hirudin/°g Salbe) zeigen Salbeneinwirkzeit und Hirudingehalt der Gewebsproben in der einfachen Varianzanalyse mit einem Signifikanzniveau von 0,003 (< 0,05) einen deutlichen Zusammenhang.

   Die Korrelation von + 0,582 im linearen Modell ist mit einem Signifikanzniveau von 0,047 (< 0,05) noch statistisch gesichert.

2. In der **Gruppe B** (1,25 mg Hirudin/°g Salbe) zeigen Salbeneinwirkzeit und Gewebekonzentration an Hirudin mit einem Signifikanzniveau von 0,228 (> 0,05) in der Varianzanalyse **keinen** Zusammenhang.

   Entsprechend liefert die lineare Korrelationsrechnung ebenfalls **keine** Beziehung.

3. In der **Gruppe C** (2,5 mg Hirudin/°g Salbe) besteht in der Varianzanalyse ein signifikanter Zusammenhang zwischen Salbeneinwirkzeit und Hirudingehalt der Gewebsproben auf einem Niveau von 0,002 (< 0,05).

   Die beiden Variablen sind dabei auf einem signifikanten Niveau von 0,001 (< 0,05) mit + 0,627 mittelgradig korreliert.

III.3. Diskussion und Beurteilung der Ergebnisse

III.3.a. Hirudinkonzentration der Salbe

Beim Vergleich der Gruppen A und B zeigt sich, daß eine höhere Hirudinkonzentration der applizierten Salbe (A: 0,5 mg/°g; B: 1,25 mg/°g) zu einem höheren Hirudingehalt in den untersuchten Gewebsproben führt.

Paradoxerweise verkehrt sich dieses Verhältnis bei weiterer Steigerung der Hirudinkonzentration in der Salbe ins Gegenteil: Der in Gruppe C (2,5 mg/°g) gemessene durchschnittliche Hirudingehalt der Proben liegt niedriger als in Gruppe A und in Gruppe B.

Die Erklärung für dieses widersprüchlich erscheinende Ergebnis liegt in der Ent-Emulgierung der applizierten Salbenpräparation: Bei Zugabe großer Hirudinmengen zur Salbengrundlage kommt es mit der Zeit nachweislich zur Entmischung der lipophilen und der hydrophilen Komponenten der Zubereitung, sodaß im epikutan aufliegenden Salbendepot de facto eine geringere als die ursprünglich vorgegebene Hirudinkonzentration von 2,5 mg Hirudin/°g Salbe vorliegt (Prof. Dr. Dr. E. FINK, PLANTORGAN; persönliche Mitteilung 1986).
Darüberhinaus beeinflußt eine derart veränderte Galenik auch die Liberation des Wirkstoffes (siehe Seite 58).
Ferner ist bei der Steigerung der Wirkstoffkonzentration in der angewandten Salbe die Möglichkeit einer limitierten Membrankapazität für Hirudin in Betracht zu ziehen: Beim perkutanen Stofftransport muß die topisch applizierte Substanz vom epikutanen Depot in die verschiedenen Hautschichten permeieren und in den Schichten selbst in Lösung gehalten werden, um als Depot für die Penetration in die nächste Schicht dienen zu können. Ist die Aufnahmefähigkeit einer Schicht für die Substanz begrenzt, so bleibt der perkutane Transport auf dieses Depotmaximum limitiert, auch wenn die Konzentration des Wirkstoffes im Applikat weiter erhöht wird (Priv.-Doz. Dr. H. PRATZEL, Inst. für Med. Balneologie und Klimatologie der Univ. München; persönliche Mitteilung, 1986).

III.3.b. Einwirkzeit der Salbe

Die Gruppe A (0,5 mg/°g) belegt in der Varianzanalyse einen zu erwartenden positiven Zusammenhang zwischen Salbeneinwirkzeit und Hirudingehalt der Gewebsproben: Längere Salbeneinwirkzeiten führen zu stärkerer Hirudinbeladung des kutanen Gewebes. Es besteht auf einem Signifikanzniveau von 0,047 eine mittlere positive Korrelation (0,582) im linearen Modell.

Trotz des durchschnittlich niedrigeren Hirudingehaltes der Proben weist auch die Gruppe C (2,5 mg/°g) diesen Zusammenhang von Einwirkzeit und Hirudingehalt der Proben auf: Dabei zeigt die Varianzanalyse eine deutlichere Signifikanz der Gruppe C im Vergleich zur Gruppe A (C: 0,002; A: 0,003) und auch die Korrelationsrechnung dokumentiert eine deutlichere Beziehung der beiden Variablen >Salbeneinwirkzeit< und >Probengehalt an Hirudin< (C: + 0,627; A: + 0,582) auf einem erheblich höheren Signifikanzniveau (C: 0,001; A: 0,047).

Als Gründe für die stärkere statistische Aussagekraft der Gruppe C lassen sich anführen:

- Die im Vergleich zur Gruppe A (n = 12) größere Probenzahl der Gruppe C (n = 30).
- Die im Vergleich zur Gruppe A (17,0 - 22,0 h; Δt = 5,0 h) größere Variationsbreite der Salbeneinwirkzeiten in der Gruppe C (16,7 - 25,6 h; Δt = 8,9 h).

III.3.b. Bei Gruppe B (1,25 mg/°g) läßt sich mit **keinem** der angewandten statistischen Prüfverfahren eine Beziehung der Variablen nachweisen.

Der Grund hierfür ist in der im Vergleich zu den anderen Gruppen (A: Δt = 5,0 h; C: Δt = 8,9 h) wesentlich geringeren Bandbreite der Salbeneinwirkzeiten (B: 18,2 - 19,6 h; Δt = 1,4 h) zu suchen.

III.3.c. Kritische Betrachtung der Auswertung

Die Auswertung mit statistischen Prüfverfahren darf nicht über die Problematik der Gewebsproben-Beurteilung hinwegtäuschen:

So sind der Stadardisierbarkeit der Gewebsprobenentnahme im Rahmen eines routinemäßigen operativen Eingriffes Grenzen gesetzt. Allein der mit der Entnahmetiefe variierende Wirkstoffgehalt des Gewebes (Gewebe-Konzentrationsgradient; vgl. SCHAEFER, ZESCH & STÜTTGEN [122]) kann deutliche Meßwertschwankungen bedingen.
Daneben sind stets auch inter-individuelle Varianzen zu berücksichtigen.

So kann und soll die durchgeführte Auswertung Tendenzen erkennen lassen, nicht aber den Anspruch auf eine absolute Quantifizierbarkeit der untersuchten Parameter erheben. In diesem Sinne wurde die Grenzziehung der statistischen Verläßlichkeit zu 5 % gewählt, und nicht, wie in der Medizin ansonsten meist üblich, zu 1 % (vgl. GELLERT, KÜSTNER, HELLWICH & KÄSTNER [106]; ÜBERLA [126]).

III.4. Zusammenfassende Beurteilung

Nach präoperativer topischer Anwendung von hirudinhaltiger Salbe im Handbereich bei 19 handchirurgischen Patienten konnten durch Testung von insgesamt 56 Hautgewebsproben im RIBA folgende Ergebnisse ermittelt werden:

(1) Bei einer Hirudin-Aktivität der applizierten Salbe von 10000 bzw. 25000 ATE/°g konnte **jeweils in 100 %** (12 von 12 Proben bzw. 14 von 14 Proben) der Hautgewebsproben **Hirudin im Nanogramm-Bereich nachgewiesen** werden.

Im Falle der höchstkonzentrierten Salbe mit 50000 ATE/°g war das Ergebnis nur in **53 % der Fälle** (16 von 30 Proben) **positiv.** Verantwortlich für diesen paradoxen Effekt ist die nachweisliche Entmischung der Salbe in ihre öligen und wäßrigen Bestandteile bei sehr hoher Hirudinkonzentration.

(2) Die Salbeneinwirkzeiten, die zu meßbaren Gewebekonzentrationen an Hirudin führten, betrugen 16,7 - 25,6 h.
Dabei zeigte sich, daß die **Gewebekonzentration mit zunehmender Salbeneinwirkzeit ansteigt.**

*

ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, mittels in-vivo-Versuchen Erkenntnisse über die perkutane Permeabilität der menschlichen Haut für Hirudin zu gewinnen.

Versuche am Tiermodell (junges Hausschwein, Pavian) dienten der Vorbereitung und Ergänzung der Untersuchungen am Menschen durch Erprobung des experimentellen Procedere, durch Ermittlung renaler Ausscheidungsparameter für Hirudin und durch Untersuchung der systemischen Verträglichkeit.

Im ERSTEN TEIL der Arbeit wird die Methode des Radioimmunobioassay (RIBA) zum sensitiven Nachweis biologisch aktiven Hirudins beschrieben. Darüberhinaus werden die Vorbereitungsmaßnahmen dargestellt, die nötig sind, um die Probenmaterialien Urin und Hautgewebe im RIBA auf Hirudin prüfen zu können.

Im ZWEITEN TEIL sind die theoretischen Grundlagen zum Verständnis des perkutanen Stofftransportes nach topischer Pharmakon-Anwendung dargestellt.

Der DRITTE TEIL beinhaltet die experimentelle Durchführung und die Ergebnisse der Absorptions- und Eliminationsstudien mit Hirudin bei Tier und Mensch.
Die wesentlichen Ergebnisse, die bei den einzelnen Spezies gewonnen werden konnten, sind auf den folgenden Seiten zusammengefaßt.

ERGEBNISSE BEIM SCHWEIN

Sowohl durch Eliminationsmessung im Urin als auch durch Bestimmung der Hirudinkonzentration in Hautgewebsproben wurde beim jungen Hausschwein die perkutane Permeation von Hirudin aus einer auf dem Rücken applizierten Salbe **in vivo** bewiesen.

Renale Eliminationsmessung

Auf 600 cm² geschorene Rückenfläche wurden 5 °g einer Salbe aufgetragen, die eine Aktivität von 50000 ATE/°g bzw. einen Hirudingehalt von 2,5 mg Hirudin /°g besaß; es lag damit eine Flächenbeladung von 20,8 µg Hirudin/cm² vor.

(1) Innerhalb von 6 h wurde im Urin ~1 µg Hirudin ausgeschieden, das entspricht 0,08 ‰ der aufgetragenen Menge an Hirudin von 12,5 mg.

(2) Die Hirudin-Ausscheidung kam erst mit einer Verzögerungszeit ("lag-time") von 270 min ab Applikation der Salbe in Gang; zuvor ließen sich nur geringfügige Mengen an Hirudin im Harn bestimmen.

(3) Ab der 270. Minute konnte bis Versuchsende (360. Minute) eine konstante Elimination festgestellt werden; die quantitative Auswertung ergab folgende Parameter der Elimination nach perkutaner Permeation:

EP (T=360 min) = 1,8 ng/cm²	ERP (t=90 min) = 1,0 ng/cm²·h
SEP (T=360 min) = 0,72 °µg/cm²	SERP (t=90 min) = 0,40 °µg/cm²·h

Gewebemessung

Auf verschiedene Felder der geschorenen Rückenhaut wurde hirudinhaltige Salbe in einer Flächenbeladung von durchschnittlich 0,12 µg Hirudin/cm² aufgetragen. Nach der Applikation wurde die Hautoberfläche mit feldweise unterschiedlichen Reinigungsmaßnahmen behandelt. Daraufhin erfolgte in den einzelnen Feldern die Entnahme von Hautgewebsproben mittels Stanze, teils unter Perforation der Hautoberfläche, teils von subkutan nach Exzision des feldtragenden Hautlappens.

(1) Je intensiver die Reinigung der Hautoberfläche nach Applikation der Salbe durchgeführt wurde, umso geringer fiel die Hirudin-Gewebekonzentration in den Proben aus; dies gilt sowohl für epidermishaltige als auch für epidermisfreie Proben.
Eine vollständige Beseitigung epidermaler (epikutan als auch korneal gelegener) Depots nicht-permeierten Hirudins konnte jedoch durch die angewandten Reinigungsmaßnahmen **nicht** sichergestellt werden.

(2) Die Gewinnung von Gewebsproben durch Stanzung von der Hautoberfläche aus birgt daher das Risiko der Hirudinverschleppung.
Aus diesem Grund war für den exakten Permeationsnachweis die Gewebsproben-Entnahme von subkutan die Methode der Wahl, da hierbei eine Hirudinverschleppung bzw. eine Messung nicht-permeierter epidermaler Depots ausgeschlossen ist.

(3) Bereits innerhalb von Minuten (2 - 5 min) kam es nach Applikation von hirudinhaltiger Salbe zu einer Permeation von Hirudin in tiefergelegene Hautschichten (Korium und Subkutis).

(4) Es wurden dabei in den (von subkutan gewonnenen) Stanzproben durchschnittlich 3,1 ng Hirudin gefunden, was einer Gewebekonzentration von 0,077 ng Hirudin/mg Gewebe entspricht.

(5) Es fanden sich somit in den unter der Stanzfläche gelegenen epidermisfreien Gewebszylindern durchschnittlich 0,7 % der anteilig pro Stanzfläche auf die Haut aufgetragenen Hirudinmenge von 11,0 ng.

ERGEBNISSE BEIM PAVIAN

13 Pavianen wurde Hirudin in Dosierungen von 0,05 - 275 µg Hirudin/kg Körpergewicht (≙ 1 - 5500 ATE/kg Körpergewicht) in 13 Erstversuchen und 2 Wiederholungsversuchen intravenös injiziert.
Die systemische Applikation wurde von den Tieren in allen 15 Versuchen komplikationslos toleriert.

Erstversuche

(1) Die individuelle renale Ausscheidungskinetik zeigte in 54 % der Fälle ein vergleichbares zeitliches Verhalten und erreichte nach 5 - 6 h jeweils ihr kumulatives Eliminationsmaximum.
In 31 % der Fälle lagen unterschiedliche Formen einer im Versuchszeitraum unvollständigen Ausscheidung vor, die sich durch lange Verzögerungszeiten ("lag-time") der renalen Elimination erklären läßt. Ursächlich sind hierfür zu nennen die paravenöse (statt intravenöse) Injektion sowie die Möglichkeit großer inter-individueller Unterschiede der renalen "lag-time".
15 % der Versuche erlaubten keine Aussage zum zeitlichen Verlauf der Ausscheidung, da im Versuchszeitraum jeweils nur eine einzige Urinportion gewonnen werden konnte.

(2) Bei 85 % der Versuche betrug die renale Hirudin-Elimination nur 4 - 47 %, wobei die prozentuale Ausscheidung mit zunehmender Dosierung degressiv anstieg.
Die restlichen 15 % der Experimente zeigten innerhalb des Versuchszeitraumes von 5 - 6 h überhaupt keine bzw. eine nur geringfügige (< 1 %) renale Elimination.

(3) Die plasmatischen Gerinnungsparameter QUICK-Wert, PTT und PTZ dokumentierten im Zeitintervall bis 75 min post injectionem ab einer Dosierung von ~ 100 µg Hirudin/kg Körpergewicht eine Gerinnungshemmung, wobei die PTZ den sensitivsten Parameter darstellte.
Bei den korpuskulären Parametern blieb die Thrombozytenzahl bei allen verwendeten Dosierungen unbeeinflußt, während bei der Leukozytenzahl in zwei Versuchen ein deutlicher Anstieg nachzuweisen war.

(4) Die sinkende Anzahl und Gesamtmenge der Urinausscheidungen bei steigender Applikationsdosis läßt einen antidiuretischen Effekt von Hirudin möglich erscheinen.

Wiederholungsversuche

(1) Die Abnahme der prozentualen Hirudin-Elimination (47 %; 7 %; 0,2 %) bei Mehrfach-Applikation am gleichen Tier (Versuche Nr. 1, 13 und 15) trotz steigender Dosierung könnte auf die Produktion von Antikörpern gegen Hirudin zurückzuführen sein.

(2) Klinische Symptome einer Allergisierung konnten jedoch weder bei Zweit- noch bei Dritt-Applikation (im Abstand von 3 bzw. 4 Monaten zur ersten Injektion) beobachtet werden.

ERGEBNISSE BEIM MENSCHEN

In Analogie zu den Versuchen am Schwein wurde auch in Human-Versuchen hirudinhaltige Salbe topisch appliziert (Brust, Rücken) und das Ausmaß der perkutanen Hirudin-Aufnahme sowohl durch renale Eliminationsmessung als auch durch Analyse von Hautgewebsproben untersucht.

Renale Eliminationsmessung

Ohne Stromeinwirkung

Erstversuche

Bei zwei Probanden wurden auf jeweils 900 cm² nicht vorbehandelte Rückenfläche je 5 °g einer hirudinhaltigen Salbe der spezifischen Aktivität von 50000 ATE/°g (entsprechend 2,5 mg Hirudin/°g) aufgetragen. Es lag damit eine Flächenbeladung von 14 µg Hirudin/cm² Haut vor.

(1) Innerhalb von T = 72 h (Versuch Nr. 1) bzw. T = 144 h (Versuch Nr. 2) wurden im Urin ~130 ng bzw. ~300 ng Hirudin ausgeschieden, das entspricht 0,01 ‰ respektive 0,02 ‰ der aufgetragenen Menge von 12,3 mg bzw. 13,3 mg Hirudin.

(2) Die Hirudin-Ausscheidung kam erst nach einer im Vergleich zum Schwein erheblich längeren renalen Verzögerungszeit ("lag-time") in Gang, nämlich erst nach 36 bzw. 60 h nach Salbenapplikation.

(3) Die Phase der konstanten Elimination dauerte bei Versuch Nr. 1 von der 36. bis zur 72. Stunde nach Salben-Auftragung (limitiert durch Versuchsende; t = 36 h), bei Versuch Nr. 2 von der 60. bis zur 132. Stunde (danach Rückgang der Elimination; t = 72 h).
Die quantitative Auswertung ergab folgende Parameter der Elimination nach perkutaner Permeation:

Versuch Nr. 1:

EP (T= 72 h) = 1441,1 ng/m²	ERP (t=36 h) = 38,1 ng/m²·h
SEP (T= 72 h) = 564,4 °µg/m²	SERP (t=36 h) = 15,2 °µg/m²·h

Versuch Nr. 2:

EP (T=144 h) = 3287,8 ng/m²	ERP (t=72 h) = 46,1 ng/m²·h
SEP (T=144 h) = 1315,1 °µg/m²	SERP (t=72 h) = 18,4 °µg/m²·h

Wiederholungsversuch

5 Monate nach Versuch Nr. 1 wurde diesem Probanden im Versuch Nr. 3 ein weiteres Mal hirudinhaltige Salbe, dieses Mal in drei annähernd gleichen Portionen, appliziert; bei Verdoppelung der Auftragungsfläche (1800 cm², Brust und Rücken) und unter Erhöhung der insgesamt applizierten Hirudinmenge (70,3 mg) wurde eine Erhöhung der Flächenbeladung um das 2,8fache auf ~ 39 µg Hirudin/cm² Haut erreicht.

(1) Trotz der erhöhten Applikationsmenge konnte in keiner der über 336 h (≙ 14 Tage) gesammelten Urinportionen mit dem RIBA Hirudin nachgewiesen werden.

(2) Die 30 min nach der ersten, 30 min nach der zweiten und 45 min nach der dritten Salbenapplikation bestimmten plasmatischen und korpuskulären Blutgerinnungsparameter zeigten **keine** über Schwankungen innerhalb des Normalbereichs hinausgehenden Veränderungen.

(3) Eine Sensibilisierung nach der ersten Salbenapplikation mit Bildung von Antikörpern gegen Hirudin, die eine Detektion im Urin verhindern, erscheint möglich, zumal analoge Beobachtungen beim Pavian (nach i.v.-Gabe) vorliegen.

Mit Stromeinwirkung

Bei einem Probanden wurden 5 °g hirudinhaltige Salbe der spezifischen Aktivität von 50000 ATE/°g (entsprechend 2,5 mg Hirudin/°g) auf eine Rückenfläche von 1786 cm^2 aufgetragen; es resultierte eine Flächenbeladung von 7 µg Hirudin/cm^2 Haut.

Nach 3 h spontaner Salbeneinwirkung wurde das Applikationsareal für 3 h der Einwirkung eines elektrischen Gleichstromfeldes einer Stromdichte von 0,1 mA/cm^2 ausgesetzt. Danach folgten 2 h wieder stromfreier Salbeneinwirkung.

Die Analyse halbstündlich gewonnener Spontan-Urinportionen erbrachte folgende Ergebnisse:

(1) In den ersten 3 h vor Stromfluß konnte im Urin **keine** Hirudinausscheidung gemessen werden.

(2) Mit einer Verzögerungszeit ("lag-time") von 0,5 h nach Stromfluß-Beginn (3,5 h nach Salbenapplikation) begann die meßbare renale Elimination und hielt bis Versuchsende (8 h nach Applikation) an.

(3) Insgesamt wurden während der 8stündigen Versuchszeit nahezu 25 µg Hirudin ausgeschieden; das entspricht 2 ‰ der applizierten Menge von 12,5 mg Hirudin.

(4) Die Phase der konstanten Elimination dauerte 2,5 h (4,0 bis 6,5 h nach Applikation) und reichte 0,5 h über die Dauer des Stromflusses hinaus.

Die Bestimmung der Eliminationsparameter nach Permeation unter Iontophorese ergab folgende Werte:

$EP_{\#}$ (T=8,0 h) = 12,9 ng/cm^2 $ERP_{\#}$ (t=2,5 h) = 4,0 ng/$cm^2 \cdot h$
$SEP_{\#}$ (T=8,0 h) = 5,16 °µg/cm^2 $SERP_{\#}$ (t=2,5 h) = 1,60 °µg/$cm^2 \cdot h$

Trotz nur halb so großer Flächenbeladung mit Wirkstoff (7 statt 14 µg Hirudin/cm^2 Haut) und erheblich kürzerer Kumulationszeit T (8 statt 72 bzw. 144 h) konnten bei topischer Anwendung von hirudinhaltiger Salbe unter Einwirkung eines elektrischen Gleichstromfeldes Permeationsparameter erzielt werden, die im Falle der EP um einen Faktor bis zu ~90, und im Falle der ERP um einen Faktor bis zu ~1000 höher liegen als bei spontaner Permeation ohne Stromeinwirkung.

Entsprechendes gilt für die SEP bzw. die SERP.

Gewebemessung

Im Rahmen routinemäßiger Operationen konnten bei 24 Patienten insgesamt 92 Hautgewebsproben gewonnen werden, nachdem präoperativ über dem Entnahmeareal hirudinhaltige Salbe epikutan appliziert worden war.

Ein falsch-positiver Hirudin-Nachweis im Gewebe wurde durch eine entsprechende Versuchsgestaltung, insbesondere durch die kontaminationsfreie Probenentnahme von subkutan ohne Perforation der Haut im Bereich des Salben-Applikationsareals, ausgeschlossen.

Die positiven qualitativen Aussagen des exemplarischen Vorversuchs (Patientenzahl n = 1, 24 Gewebsproben) und der > Serie in kleiner Fallzahl< (n = 4; 12 Proben) wurden bestätigt und ergänzt durch die semi-quantitativen Ergebnisse der >erweiterten klinischen Studie< (n = 19; 56 Proben):

Es wurde hirudinhaltige Salbe in den 3 Konzentrationen 10000, 25000 und 50000 ATE/°g Salbe (entsprechend 0,5, 1,25 und 2,5 mg Hirudin/°g Salbe) angewandt. Die Salbeneinwirkzeiten variierten von 16,7 - 25,6 h.

(1) Bei einer Hirudin-Aktivität der applizierten Salbe von 10000 bzw. 25000 ATE/°g zeigten jeweils 100 % (12 von 12 Proben bzw. 14 von 14 Proben) der durchschnittlich 44 mg schweren Proben einen Hirudingehalt im Nanogramm-Bereich.

Im Falle der höchstkonzentrierten Salbe mit 50000 ATE/°g war das Ergebnis nur in 53 % (16 von 30 Proben) der Fälle positiv.

(2) Die Steigerung der Salbenkonzentration von 10000 auf 25000 ATE/°g bewirkte eine Steigerung des durchschnittlichen Hirudingehaltes der Gewebsproben bei annähernd gleicher Salbeneinwirkzeit.

Die weitere Steigerung der Hirudinkonzentration in der Salbe auf 50000 ATE/°g besaß eine gegenteilige Wirkung und senkte den durchschnittlichen Hirudingehalt der Gewebsproben.

Die paradoxen Ergebnisse bei Anwendung der höchstkonzentrierten Zubereitung (50000 ATE/°g) sind zu erklären durch die nachweisliche Entmischung der Salbe in ihre lipophilen und hydrophilen Komponenten aufgrund des hohen Hirudinanteils.

(3) Längere Salbeneinwirkzeiten führten zu einem höheren Hirudingehalt in den Gewebsproben.

* * *
*

Tab. 6: Individuelles Ausscheidungsverhalten für Hirudin nach intravenöser Applikation beim Pavian

GRUPPE	Portion	VERSUCH							
		Nr.2				Nr.10			
		Zeitpunkt der Gewinnung	Urinvolumen	pH-Wert	Hirudingehalt der Portion	Zeitpunkt der Gewinnung	Urinvolumen	pH-Wert	Hirudingehalt der Portion
		[min]	[ml]	[pH]	[µg]	[min]	[ml]	[pH]	[µg]
A	1	30	30	7,8	0,030	55	44	8,0	0,057
	2	90	7	7,1	0,005	85	14	8,2	∅
	3	230	16	6,2	∅	150	29	7,9	∅
	4	265	10	7,6	∅	180	13	8,0	∅
	5	290	12	7,5	∅	215	9	8,0	∅
	6	310	12	7,4	∅	240	41	7,7	∅
	7	325	12	7,3	∅	280	22	7,9	∅
	8	---	--	---	-	330	22	7,9	∅

Tab. 6: Individuelles Ausscheidungsverhalten für Hirudin nach intravenöser Applikation beim Pavian (Forts.)

GRUPPE	Portion	VERSUCH Nr.11			
		Zeitpunkt der Gewinnung	Urinvolumen	pH-Wert	Hirudingehalt der Portion
		[min]	[ml]	[pH]	[µg]
A	1	80	27	7,5	0,104
	2	140	24	7,5	ø
	3	210	17	7,6	ø
	4	220	60	7,7	ø
	5	240	45	7,8	ø
	6	295	13	8,3	ø
	7	330	17	8,0	ø
	8	---	--	---	-

Tab. 6: Individuelles Ausscheidungsverhalten für Hirudin nach intravenöser Applikation beim Pavian (Forts.)

GRUPPE	Portion	VERSUCH							
		Nr.8				Nr.9			
		Zeitpunkt der Gewinnung	Urinvolumen	pH-Wert	Hirudingehalt der Portion	Zeitpunkt der Gewinnung	Urinvolumen	pH-Wert	Hirudingehalt der Portion
		[min]	[ml]	[pH]	[µg]	[min]	[ml]	[pH]	[µg]
B	1	40	76	8,1	0,633	15	35	7,9	keine meßbare Hirudinausscheidung
	2	160	34	8,1	0,078	40	40	8,0	
	3	190	20	8,2	0,050	75	72	8,1	
	4	275	44	7,9	Ø	160	36	7,9	
	5	---	--	---	-	240	31	7,6	

Tab. 6: Individuelles Ausscheidungsverhalten für Hirudin nach intravenöser Applikation beim Pavian (Forts.)

GRUPPE	Portion	VERSUCH							
		Nr.1				Nr.7			
		Zeitpunkt der Gewinnung	Urinvolumen	pH-Wert	Hirudingehalt der Portion	Zeitpunkt der Gewinnung	Urinvolumen	pH-Wert	Hirudingehalt der Portion
		[min]	[ml]	[pH]	[µg]	[min]	[ml]	[pH]	[µg]
C	1	195	45	7,4	1,320	35	45	8,0	0,090
	2	Trotz einer Versuchsdauer von 555 min konnte keine weitere Urinportion gewonnen werden.				140	24	8,3	0,152
	3					305	33	8,1	0,205

Tab. 6: Individuelles Ausscheidungsverhalten für Hirudin nach intravenöser Applikation beim Pavian (Forts.)

GRUPPE	Portion	VERSUCH Nr.6			
		Zeitpunkt der Gewinnung	Urinvolumen	pH-Wert	Hirudingehalt der Portion
		[min]	[ml]	[pH]	[µg]
C	1	10	18	8,1	0,075
	2	70	42	8,0	0,947
	3	240	30	7,5	0,126
	4	330	13	7,9	Ø

Tab. 6: Individuelles Ausscheidungsverhalten für Hirudin nach intravenöser Applikation beim Pavian (Forts.)

GRUPPE	Portion	VERSUCH Nr.4 Zeitpunkt der Gewinnung	Urinvolumen	pH-Wert	Hirudingehalt der Portion	VERSUCH Nr.5 Zeitpunkt der Gewinnung	Urinvolumen	pH-Wert	Hirudingehalt der Portion
		[min]	[ml]	[pH]	[µg]	[min]	[ml]	[pH]	[µg]
D	1	85	12	7,9	0,028	80	16	8,0	1,696
	2	130	8	8,2	0,011	130	8	8,1	0,176
	3	200	7	7,8	0,023	220	11	8,0	0,286
	4	330	10	7,8	0,038	250	7	8,3	0,107
	5	---	--	---	-----	335	15	8,2	0,221
		Nr.3							
	1	80	35	7,9	3,270				
	2	175	33	8,0	0,420				

Zu Versuch Nr.3:

Trotz einer Versuchsdauer von 295 min konnte keine weitere Urinportion gewonnen werden.

Tab. 6: Individuelles Ausscheidungsverhalten für Hirudin nach intravenöser Applikation beim Pavian (Forts.)

GRUPPE	Portion	VERSUCH Nr.14			
		Zeitpunkt der Gewinnung	Urinvolumen	pH-Wert	Hirudingehalt der Portion
		[min]	[ml]	[pH]	[µg]
E	1	215	6	10,0	2,202
	2	270	5	9,8	4,262
	3	320	9	9,2	13,571

Tab. 6: Individuelles Ausscheidungsverhalten für Hirudin nach intravenöser Applikation beim Pavian (Forts.)

GRUPPE	Portion	VERSUCH							
		Nr.13				Nr.15			
		Zeitpunkt der Gewinnung	Urinvolumen	pH-Wert	Hirudingehalt der Portion	Zeitpunkt der Gewinnung	Urinvolumen	pH-Wert	Hirudingehalt der Portion
		[min]	[ml]	[pH]	[µg]	[min]	[ml]	[pH]	[µg]
F	1	80	40	8,1	82,944	260	6	10,2	2,523
	2	285	8	8,1	5,952	Trotz einer Versuchsdauer von 365 min konnte keine weitere Urinportion gewonnen werden.			
		Trotz einer Versuchsdauer von 345 min konnte keine weitere Urinportion gewonnen werden.							
		Nr.12							
G	1	325	18	7,0	866,304				
		Innerhalb der Versuchsdauer von 345 min konnte keine weitere Urinportion gewonnen werden.							

Tab. 7: Beeinflussung der Blutgerinnung beim Pavian durch intravenöse Gabe von Hirudin

Applizierte Dosis: 275,105 [µg Hirudin / kg Körpergewicht]

Versuch Nr.12 (Gruppe G)	QUICK [%]	PTT [s]	PTZ [s]	Thrombozyten $\left[\frac{1}{\mu l}\right] \times 10^5$	Leukozyten $\left[\frac{1}{\mu l}\right] \times 10^3$
Vor Applikation	100	46,2	24,1	2,15	12,1
30 min nach Applikation	95	65,1	> 150,0	2,39	11,5
60 min nach Applikation	77	91,8	36,1	2,33	13,0

Applizierte Dosis: 95,015 [µg Hirudin / kg Körpergewicht]

Versuch Nr.13 (Gruppe F)	QUICK [%]	PTT [s]	PTZ [s]	Thrombozyten $\left[\frac{1}{\mu l}\right] \times 10^5$	Leukozyten $\left[\frac{1}{\mu l}\right] \times 10^3$
Vor Applikation	90	47,7	24,6	1,95	11,7
30 min nach Applikation	89	60,9	35,9	2,12	14,2
60 min nach Applikation	90	58,3	26,6	2,40	10,9

Applizierte Dosis: 39,063 [µg Hirudin / kg Körpergewicht]

Versuch Nr.14 (Gruppe E)	QUICK [%]	PTT [s]	PTZ [s]	Thrombozyten $\left[\frac{1}{\mu l}\right] \times 10^5$	Leukozyten $\left[\frac{1}{\mu l}\right] \times 10^3$
Vor Applikation	98	48,3	24,3	3,23	9,0
45 min nach Applikation	100	52,0	22,3	3,22	6,6
75 min nach Applikation	100	51,2	23,1	3,44	11,8

Tab. 7: (Forts.) Beeinflussung der Blutgerinnung beim Pavian durch intravenöse Gabe von Hirudin

Applizierte Dosis: 102,925 [µg Hirudin / kg Körpergewicht]

Versuch Nr.15 (Gruppe F)	QUICK [%]	PTT [s]	PTZ [s]	Thrombozyten $\left[\frac{1}{\mu l}\right] \times 10^5$	Leukozyten $\left[\frac{1}{\mu l}\right] \times 10^3$
Vor Applikation	100	44,8	24,8	4,42	9,2
45 min nach Applikation	99	58,8	25,5	3,65	8,9
75 min nach Applikation	98	57,8	24,6	3,49	18,9

Tab. 18: Individualdaten der Patienten der erweiterten klinischen Studie (n = 19) zur perkutanen Absorption von Hirudin aus Blutegel-Rohextrakt-Salbe

GRUPPE A: Salbenkonzentration 10 000 ATE/°g (≙ 0,5 mg Hirudin/°g)

PA-TIENT	Ge-schlecht	Alter	Körper-gewicht	Körper-größe	Operations-indikation	Applikations-region
Nr.	m/w	[a]	[kg]	[cm]		
I	m	70	70	162	Karpaltunnel-Syndrom rechts	Thenar der rechten Hand
II	w	54	69	161	Karpaltunnel-Syndrom rechts	Thenar der rechten Hand
III	m	41	86	184	DUPUYTRENsche Kontraktur D 4 rechts	Hohlhand rechts
IV	m	60	68	166	DUPUYTRENsche Kontraktur D 4 links	Hohlhand links

GRUPPE B: Salbenkonzentration 25000 ATE/°g (≙ 1,25 mg Hirudin/°g)

PA-TIENT	Ge-schlecht	Alter	Körper-gewicht	Körper-größe	Operations-indikation	Applikations-region
Nr.	m/w	[a]	[kg]	[cm]		
V	m	41	70	184	DUPUYTRENsche Kontraktur D 4 rechts	Hohlhand rechts
VI	m	72	84	179	Karpaltunnel-Syndrom rechts	Thenar der rechten Hand
VII	m	42	65	174	DUPUYTRENsche Kontraktur D 4 links	Hohlhand links
VIII	w	56	56	154	Rhizarthrose rechter Daumen	Thenar der rechten Hand (radialseitig)
IX	m	40	85	156	Karpaltunnel-Syndrom rechts	Thenar der rechten Hand

Tab. 18: (Forts.) Individualdaten der Patienten der erweiterten klinischen Studie (n = 19) zur perkutanen Absorption von Hirudin aus Blutegel-Rohextrakt-Salbe

GRUPPE C: Salbenkonzentration 50000 ATE/°g (≙ 2,5 mg Hirudin/°g)

PATIENT	Geschlecht	Alter	Körpergewicht	Körpergröße	Operationsindikation	Applikationsregion
Nr.	m/w	[a]	[kg]	[cm]		
X	m	19	59	171	Pseudarthrose des Os naviculare der rechten Hand	Fovea radialis rechts (Tabatière)
XI	m	40	75	172	DUPUYTRENsche Kontraktur D 2-4 rechts	Hohlhand rechts
XII	w	57	57	163	Karpaltunnel-Syndrom und Ganglion rechte Hand	Thenar der rechten Hand
XIII	m	45	66	174	DUPUYTRENsche Kontr. D 5 li, erstes Rezidiv	Hohlhand links
XIV	m	72	68	169	DUPUYTRENsche Kontraktur D 4 links	Hohlhand links
XV	w	37	60	165	Karpaltunnel-Syndrom rechts	Thenar der rechten Hand
XVI	w	70	52	154	Karpaltunnel-Syndrom rechts	Thenar der rechten Hand
XVII	m	51	72	179	DUPUYTRENsche Kontraktur D4/5 rechts	Hohlhand rechts
XVIII	m	53	83	192	DUPUYTRENsche Kontraktur D 3/4 links	Hohlhand links
XIX	m	44	58	165	DUPUYTRENsche Kontraktur D 5 links	Hohlhand links

Tab. 19: Meßwerte der RIBA-Testung humaner Hautgewebsproben auf Hirudin nach topischer Applikation von Blutegel-Rohextrakt-Salbe

(Erweiterte klinische Studie mit Fallzahl n = 19)

GRUPPE A: Salbenkonzentration 10000 ATE/°g (≙ 0,5 mg Hirudin/°g)

PATIENT Entnahme-region	Salben-ein-wirk-zeit	Gesamt-menge applizier-ten Hirudins	Probe	Bindung p der Probe im RIBA	Gesamt-gehalt der Probe an Hirudin	Gewicht der Probe	Gewebe-konzentration an Hirudin	Semi-quantitative Klassi-fizierung
	[h]	[mg]	Nr.	[%]	[ng]	[mg]	[pg Hirudin / mg Gewebe]	Ø/+/++/+++
I Daumen-ballen	17,0	0,475	1	76,9	0,7	54,8	13	+
			2	81,6	0,5	76,4	7	+
			3	30,3	4,8	100,6	48	+
II Daumen-ballen	18,3	0,475	4	- 4,3 *	> 6,2	129,3	> 48	+ + *
			5	15,6	> 6,2	34,9	> 178	+ + +
			6	48,0	2,2	69,7	32	+
III Hohl-hand	20,3	0,460	7	90,4	< 0,4	29,7	< 14	+
			8	83,4	0,4	13,4	30	+
			9	79,5	0,5	27,7	18	+
IV Hohl-hand	22,0	0,480	10	20,8	> 6,2	33,6	> 185	+ + +
			11	35,1	3,7	14,0	264	+ + +
			12	8,0	> 6,2	35,4	> 175	+ + +

* Es kann aufgrund der prozentualen Bindung p davon ausgegangen werden, daß eine Gewebekonzentration von >50 pg Hirudin/mg Gewebe vorliegt (vgl. Legende zu Tab. 14, S. 110).

GRUPPE B: Salbenkonzentration 25000 ATE/°g (≙ 1,25 mg Hirudin/°g)

	[h]	[mg]	Nr.	[%]	[ng]	[mg]	[pg Hirudin / mg Gewebe]	Ø/+/++/+++
V Hohl-hand	18,2	1,200	13	9,4	> 6,2	56,8	> 109	+ + +
			14	16,0	> 6,2	43,8	> 142	+ + +
			15	34,4	4,0	37,2	108	+ + +
VI Daumen-ballen	18,5	1,163	16	76,2	0,7	64,6	11	+
			17	14,3	> 6,2	53,1	> 117	+ + +
			18	75,5	0,7	17,0	41	+
VII Hohl-hand	18,6	1,213	19	8,2	> 6,2	30,8	> 201	+ + +
			20	30,0	4,8	11,7	410	+ + +
			21	15,0	> 6,2	14,4	> 431	+ + +
VIII Daumen-ballen	19,0	1,138	22	16,8	> 6,2	59,1	> 105	+ + +
			23	16,9	> 6,2	56,5	> 110	+ + +
			--					
IX Daumen-ballen	19,6	1,200	24	1,0	> 6,2	43,1	> 144	+ + +
			25	14,7	> 6,2	18,9	> 328	+ + +
			26	43,5	2,5	60,2	42	+

Tab. 19: (Forts.) **Meßwerte der RIBA-Testung humaner Hautgewebsproben auf Hirudin nach topischer Applikation von Blutegel-Rohextrakt-Salbe**

(Erweiterte klinische Studie mit Fallzahl n = 19)

GRUPPE C: Salbenkonzentration 50000 ATE/°g (≙ 2,5 mg Hirudin/°g)

PATIENT Entnahme-region	Salben-ein-wirk-zeit	Gesamt-menge applizier-ten Hirudins	Probe	Bindung p der Probe im RIBA	Gesamt-gehalt der Probe an Hirudin	Gewicht der Probe	Gewebe-konzentration an Hirudin	Semi-quantitative Klassi-fizierung
	[h]	[mg]	Nr.	[%]	[ng]	[mg]	[pg Hirudin / mg Gewebe]	Ø/+/++/+++
X Hand-rücken	16,7	2,325	27	110,4	---	30,9	-----	Ø
			28	101,7	---	28,7	-----	Ø
			29	100,9	---	14,3	-----	Ø
XI Hohl-hand	17,5	2,250	30	49,1	2,1	46,7	45	+
			31	94,7	< 0,4	45,2	< 9	+
			32	90,3	< 0,4	16,8	< 2	+
XII Daumen-ballen	17,5	2,375	33	89,3	< 0,4	34,7	< 12	+
			34	101,2	---	29,0	-----	Ø
			35	130,3	---	51,6	-----	Ø
XIII Hohl-hand	19,0	2,275	36	78,1	0,6	16,2	37	+
			37	105,1	---	21,5	-----	Ø
			38	105,6	---	29,9	-----	Ø
XIV Hohl-hand	19,0	2,375	39	104,2	---	23,2	-----	Ø
			40	97,4	< 0,4	27,2	< 15	+
			41	99,6	---	18,4	-----	Ø
XV Daumen-ballen	19,5	2,275	42	67,5	1,0	61,1	16	+
			43	101,7	---	40,4	-----	Ø
			44	107,8	---	21,7	-----	Ø
XVI Daumen-ballen	20,0	2,400	45	1,7	> 6,2	44,6	> 139	+ + +
			46	20,2	> 6,2	23,7	> 262	+ + +
			47	6,2	> 6,2	15,1	> 411	+ + +
XVII Hohl-hand	20,5	2,400	48	85,7	< 0,4	44,9	< 9	+
			49	100,9	---	37,1	-----	Ø
			50	113,1	---	27,8	-----	Ø
XVIII Hohl-hand	20,8	2,425	51	107,2	---	49,5	-----	Ø
			52	91,6	< 0,4	72,4	< 6	+
			53	96,7	< 0,4	52,0	< 8	+
XIX Hohl-hand	25,6	2,275	54	15,0	> 6,2	24,9	> 249	+ + +
			55	- 11,3 *	> 6,2	14,0	> 443	+ + +
			56	38,0	3,3	39,9	83	+ +

* Bezüglich des negativen Vorzeichens wird auf die Legende zu Tab. 14, Seite 110 verwiesen.

VERWENDETE SUBSTANZEN

Hirudin: Es wurde ausschließlich herkömmlich aus Blutegelhomogenaten extrahiertes Hirudin verwendet; gentechnologisch produziertes Hirudin wurde nicht eingesetzt.

Darreichungsformen:

- Reinsthirudin (in lyophilisierter Form) zur Injektion
- Hirudinhaltige Blutegel-Rohextrakt-Salbe (Zubereitung mit Exhirud-Salbengrundlage) zur topischen Anwendung

Die jeweils vorliegende Aktivität (ATE) bzw. Hirudinmenge (mg) war unterschiedlich und ist den einzelnen Versuchsbeschreibungen zu entnehmen.

Die Hirudin-Präparationen wurden freundlicherweise von der Firma PLANTORGAN, Bad Zwischenahn, zur Verfügung gestellt.

Chromozym TH: Chromogenes Substrat für Thrombin (Tosyl-Glycin-Prolin-Arginin-p-Nitroanilid)

Hersteller: BOEHRINGER, Mannheim

Test-Thrombin: Standardisiertes lyophilisiertes Proteinpräparat aus Rinderplasma (Aktivität nach Lösung in Aqua dest. nach Vorschrift: 3 IU/ml)

Hersteller: BEHRING, Marburg

Aprotinin (Trasylol^R): Serinproteasen-Inhibitor mit breiter Hemmspezifität (1 mg ≙ 6600 KIU)

Geschenk von BAYER, Leverkusen

Pepstatin A: Pepsin-Inhibitor (MG = 685,9)

Hersteller: SIGMA CHEMIE, Taufkirchen/München

Natriumazid: Antimikrobielle Substanz (MG = 65,01)

Hersteller: MERCK, Darmstadt

RSA: Rinderserum-Albumin, Lyophilisat (MG = 68000) Albumingehalt > 98 %

Hersteller: BOEHRINGER, Mannheim

EDTA (Titriplex^R III): Äthylendiamintetraessigsäure (MG = 372,24)

Hersteller: MERCK, Darmstadt

SBTI: Trypsininhibitor aus Sojabohnen (MG = 22000) Lyophilisat, salzfrei, reinst; ca. 35 IU/mg

Hersteller: SERVA FEINBIOCHEMICA, Heidelberg

E 64: Cysteinproteasen-Inhibitor (L-trans-Epoxysuccinyl-leucylamido(4-guanidino)butane)

Bezug: SIGMA CHEMIE, Taufkirchen/München

Narkotika/Sedativa:	**Hypnodil**[R]	(Metomidat) Hersteller: CILAG, Alsbach
	Ketanest[R]	(Ketamin-HCl; 50 mg/ml) Hersteller: PARKE-DAVIS, Freiburg
	Nembutal[R]	(Pentobarbital) Hersteller: ABBOTT, Ingelheim am Rhein
	Stresnil[R]	(Azaperon) Hersteller: JANSSEN, Neuss
	Vetranquil[R]	(Acepromazinmaleat) Hersteller: ALBRECHT, Aulendorf/Württ.

An weiteren Substanzen (zur Pufferherstellung etc.) wurden die im Labor bevorrateten Reagenzien üblicher Reinheit verwendet.

Die Desinfektionsmittel (Freka, Kodan, Äther) entstammten dem Routine-Beschaffungsprogramm der Chirurgischen Klinik.

Bezüglich der für den RIBA notwendigen Reagenzien wird auf die Originalarbeit von DODT [134] verwiesen.

*

VERWENDETE GERÄTE

Automatic Gamma Counting System MR 1032

Hersteller: W+W ELEKTRONIK

Drucker Typ 024-EA (zum Photometer 1101 M)

Hersteller: KIENZLE, Villingen

Feingewichts-Waagen Typ 2 474 und **Typ 3 716 MP**

Hersteller: SARTORIUS, Göttingen

Gefriertrockner Wkf Typ L 05-70

Hersteller: GESELLSCHAFT FÜR ELEKTROPHYSIKALISCHEN APPARATEBAU, Brandau/Odw.

Homogenisierungsgerät Typ Potter (elektrisch)

Hersteller: BRAUN, Melsungen

Homogenisatorgefäß 5 ml mit eng eingeschliffenem Kolben, beides aus Borosilikatglas (passend zum Gerät Potter)

Hersteller: BRAUN, Melsungen

Millipore-Sterilfilter der Porengröße 5 µm

Bezug: WATERS, Niederlassung Feldkirchen/München

PD 10-Säule (enthält Sephadex G-25 M)

Hersteller: PHARMACIA FINE CHEMICALS, Uppsala (Schweden)

Photometer 1101 M (mit Filter für 405 nm)

Hersteller: EPPENDORF, Hamburg

SEP-PAK-C 18-Kartusche (enthält eine Matrix aus unpolarem C_{18}-kettigen organischen Material)

Bezug: WATERS, Niederlassung Feldkirchen/München

Speed Vac Concentrator (Zentrifuge zum Gefriertrockner)

Hersteller: BACHOFER (Laboratoriumsgeräte), Reutlingen

Tisch-Zentrifuge Typ 3200

Hersteller: EPPENDORF, Hamburg

Die übrigen Materialien wie Küvetten, Injektionsspritzen, Röhrchen zur Blutgerinnungsuntersuchung, Katheter, Folien etc. sind nicht gesondert aufgeführt, da sie der Bevorratung des Routine-Betriebes von Labor und Klinik entstammten.

*

VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

AHC-Puffer	Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer
ATE	Anti-Thrombin-Einheit(en)
B	Zählrate einer Probe im Gamma-Counter (RIBA-Testung)
B_o	Zählrate einer Leerprobe (ohne Hirudin)
cpm	counts per minute
DIC	Disseminierte intravasale Coagulation
DMAC	Dimethylacetamid
DMFA	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
E 64	siehe Substanzenverzeichnis (Anhang, Seite XV)
EDTA	siehe Substanzenverzeichnis (Anhang, Seite XV)
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EP	(renale) Elimination nach Permeation
ERP	(renale) Eliminations-Rate nach Permeation
GC	gas chromatography
g	Gramm (an reinem Wirkstoff, z.B. Hirudin)
°g	Gramm (an wirkstoffhaltiger Salbe, z.B. Blutegel-Rohextrakt-Salbe)
HP	Haut-Permeation
HPR	Haut-Permeations-Rate
HPLC	high pressure liquid chromatography
INH-Puffer	Inhibitor-Puffer
IU	Inhibitor-Unit
i.p.	intra-peritoneal
i.v.	intra-venös
MG	Molekulargewicht
MHz	Mega-Hertz
mIU	milli-Inhibitor-Unit
N	Allgemeine Grundaktivität im Gamma-Counter durch unspezifische Bindung (RIBA-Testung)
NIH-E	Thrombin-Einheit, definiert durch das National Institute of Health von Amerika

p	prozentuale Bindung im RIBA
PEG-Puffer	Polyethylenglykol-Puffer
ppb	parts per billion
ppm	parts per million
PTT	partial thromboplastin time (Partielle Thromboplastin-Zeit)
PTZ	Plasma-Thrombin-Zeit (auch kurz: Thrombinzeit)
RIA	Radioimmunoassay
RIBA	Radioimmunobioassay
RSA	siehe Substanzenverzeichnis (Anhang, Seite XV)
SBTI	siehe Substanzenverzeichnis (Anhang, Seite XV)
SEP	(renale) Standard-Elimination nach Permeation
SERP	(renale) Standard-Eliminations-Rate nach Permeation
SHP	Standard-Haut-Permeation
SHPR	Standard-Haut-Permeations-Rate
STD-Puffer	Standard-Puffer
TLC	thin layer chromatography
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
Vorsilben: m	milli ($\times 10^{-3}$)
μ	mikro ($\times 10^{-6}$)
n	nano ($\times 10^{-9}$)
p	piko ($\times 10^{-12}$)

*

VERWENDETES SCHRIFTTUM

PERIODIKA

001 **ALLENBY A., FLETCHER J., SCHOCK C., TEES T.**

The effect of heat, pH and organic solvents on the electrical impedance and permeability of excised human skin

Br. J. Dermatol., **81** <Suppl. 4>, 1969, 31 ff

002 **ANDERSON V.**

Percutaneous absorption and systemic toxicity

Int. J. Dermatol., **15** <Suppl.>, 1976, 68 ff

003 **BAILLIE A.**

Carbamide in hyperkeratosis

Practitioner, **210**, 1973, 294 ff

004 **BARR M.**

Percutaneous Absorption

J. pharm. Sci., **51**, 1962, 395 ff

005 **BARRETT C., HADGRAFT J., SARKANY I.**

The influence of vehicles on skin penetration

J. Pharm. Pharmacol., **16** <Suppl.>, 1964, 104 ff

006 **BAUER K.**

Biopharmazeutische Überlegungen und Experimente bei der Entwicklung von Arzneizubereitungen

Rheinisches Ärzteblatt, 1975, 119 ff

007 **BETTLEY F.**

The influence of soap on the permeability of the epidermis

Br. J. Dermatol., **73**, 1961, 468 ff

008 **BETTLEY F.**

The influence of detergents and surfactants on epidermal permeability

Br. J. Dermatol., **77**, 1965, 98 ff

009 **BETTLEY F.**

Die Permeabilität der Haut in Beziehung zu Reinigungsmitteln

Z. Hautkr., **122**, 1967, 79 ff

010 **BETTLEY F., DONOGHUE E.**

Effect of soap on the diffusion of water through isolated human epidermis

Nature, **185**, 1960, 17 ff

011 **BLANK I.**

Einige Gedanken über die Wirkung oberflächenaktiver Stoffe auf die perkutane Absorption

Z. Hautkr., **121**, 1966, 555

012 **BLANK I., SCHEUPLEIN R.**

Transport into and within the skin

Br. J. Dermatol., **81** <Suppl. 4>, 1969, 4 ff

013 **BLANK I., SCHEUPLEIN R., MACFARLANE D.**

Mechanism of percutaneous absorption
III. The effect of temperature on the transport of non-electrolytes across the skin

J. Invest. Dermatol., **45**, 1967, 582 ff

014 **BOGS U., NAUMANN H.**

Zur Beurteilung pharmazeutisch verwendeter Emulgierhilfsstoffe
I. Mitteilung: Die Bestimmung der Grenzflächenspannung

Pharmazie, **16**, 1961, 396 ff

015 **BRANDIS F., ROTHE H.**

Behandlungsmöglichkeiten mit Exhirud, einem Nativ-Blutegelvollsekret-Präparat

Therapie der Gegenwart, **2**, 1957 (Sonderdruck)

016 **BUCHTELA K., HACKL H.**

Einfluß der Wärme auf die percutane Resorption

Med. Welt., **19**, 1968, 2405 ff

017 **BYE P., MORISON W., RHODES E.**

The absorption of hexachlorophene from ultralanum ointment

Br. J. Dermatol., **93**, 1975, 209 ff

018 **CHILCOTE R., CURLEY A., LOUGHLIN H., JUPIN J.**

Hexachlorophene storage in a burn patient associated with encephalopathy

Pediatrics, **59**, 1977, 457 ff

019 **CHRISTOPHERS E., BRAUN-FALCO O.**

Epidermale Regeneration am Meerschweinchenohr nach Hornschichtabriß

Arch. Klin. Exp. Dermatol., **231**, 1968, 85 ff

020 **CUMMINGS E.**

Temperature and concentration effects on penetration of N-octylamine through human skin in situ

J. Invest. Dermatol., **53**, 1969, 64 ff

021 **DAVID N.**

The pharmacology of dimethyl sulfoxide

Ann. Rev. Pharmacol., **12**, 1972, 353 ff

022 DECKER R.

Nature and regulation of energy metabolism in the epidermis

J. Invest. Dermatol., **57**, 1971, 351 ff

023 DEMSKI R., DEMARCO J., MARCUS A.

An in vitro study of the relative moisture occlusive properties of several topical vehicles and Saran wrap

J. Invest. Dermatol., **44**, 1965, 361 ff

024 DEUSER E.

Über Behandlungsmethoden von Distorsionen, Kontusionen und Hämatomen im Sportgeschehen

Sportarzt und Sportmedizin, **5**, 1971, 112 f

025 DIRNAGL K., DREXEL H.

Die quantitative Erfassung der Aufnahme von Quellinhaltsstoffen in der Haut und durch die Haut

Arch. Phys. Ther., **15**, 1963, 283 ff

026 DODT J., MÜLLER H., SEEMÜLLER U., CHANG J.

Identification of cysteine and cysteine containing peptide by colour carboxymethylation: application to the complete sequencing of hirudin, a thrombin specific inhibitor

FEBS Lett., **165**, 1984, 180 ff

027 DODT J., SEEMÜLLER U., MASCHLER R., FRITZ H.

The complete Covalent Structure of Hirudin
(Localization of the Disulfide Bonds)

Biol. Chem. Hoppe-Seyler, **366**, 1985, 379 ff

028 DREXEL H., DIRNAGL K., PRATZEL H.

Experimentelle Befunde zum chemischen Wirkungsmechanismus der Sole- und Seebäder

Z. Physikal. Med., **1**, 1970, 201 ff

029 DUGARD P., SCHEUPLEIN R.

Effects of ionic surfactants on the permeability of human epidermis:
An electrometric study

J. Invest. Dermatol., **60**, 1973, 263 ff

030 EAGLSTEIN W., FARZAD A., CAPLAND L.

Topical corticosteroid therapy: Efficacy of frequent application

Arch. Dermatol., **110**, 1974, 955 f

031 ELFBAUM S., LADEN K.

The effect of dimethyl sulfoxide on percutaneous absorption:
A mechanistic study, part I

J. Soc. Cosmet. Chem., **19**, 1968, 119 ff

032 ELFBAUM S., LADEN K.

The effect of dimethyl sulfoxide on percutaneous absorption:
A mechanistic study, part II

J. Soc. Cosmet. Chem., **19**, 1968, 163 ff

033 FALKSON G., SCHULTZ E.

Skin changes in patients treated with 5-fluouracil

Br. J. Dermatol., **74**, 1962, 229 ff

034 FELDMANN R., MAIBACH H.

Penetration of ^{14}C-hydrocortisone through normal skin
The effect of stripping and occlusion

Arch. Dermatol., **91**, 1965, 661 ff

035 FELDMANN R., MAIBACH H.

Regional variation in percutaneous penetration of ^{14}C cortisol in man

J. Invest. Dermatol., **48**, 1967, 181 ff

036 FELDMANN R., MAIBACH H.

Percutaneous penetration of some pesticides and herbicides in man

Toxicol. Appl. Pharmacol., **28**, 1974, 126 ff

037 FERRY D., ROBERTS M.

Hexachlorophane absorption in premature infants and surgical patients

Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., **4**, 1972, 211 f

038 FISHER L., MAIBACH H.

The effect of occlusive and semipermeable dressings on the mitotic activity of normal and wounded human epidermis

Br. J. Dermatol., **86**, 1972, 593 ff

039 FRANKE-AUGST H., SPEISER P., LUTZ O.

Zur Wirkstoff-Freigabe aus Suspensionssalben

Pharm. Ind., **39**, 1977, 76 ff

040 FRANZ E., IPPEN H.

Fluorescent microscopical studies in psoriasis after dithranol and tar treatment

Arch. Dermatol. Forsch., **255**, 1976, 102 ff

041 FREDERIKSSON T.

Influence of solvents and surface active agents on the barrier function of the skin towards sarin
I. Development of method

Acta Derm.-Venereol., **43**, 1963, 91 ff

042 FREDERIKSSON T.

Influence of solvents and surface active agents on the barrier function of the skin towards sarin
III. Restoration of the barrier function

Acta Derm.-Venereol., **49**, 1969, 481 ff

043 F.S.

Blutegel-Wirkstoffe jetzt gentechnisch gewonnen: Hirudin als modernes Antikoagulans (Symposium >Ex Hirudine<, München 14./15. Dez. 1984)

Selecta, **17**, 1985, 3 ff (Sonderdruck)

044 GOLLNICK N.

Zur Behandlung des Status varicosus

Med. Welt, **47**, 1963, 2417 ff (Sonderdruck)

045 GRIFFIN J., TOUCHSTONE J.

Ultrasonic movement of corticosteroids into pig tissues

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **109**, 1962, 461 ff

046 HAAS G.

Über Blutwaschung

Klin. W.schr., **7**, 1928, 1356 ff

047 HARTMANN F.

Percutane Resorption antirheumatischer Substanzen

Z. Rheumaforsch., **27**, 1968, 12 ff

048 HAUSTEIN K., MARKWARDT F.

Über den Einfluß von Hemmstoffen der Blutgerinnung und Fibrinolyse auf das SANARELLI-SHWARTZMANN-Phänomen

Thrombos. Diathes. haemorrh., **13**, 1965, 60 ff

049 HAYCRAFT J.

Über die Einwirkung eines Secretes des officinellen Blutegels auf die Gerinnbarkeit des Blutes

Arch. Exp. Pathol. Pharmakol., **18**, 1884, 209 ff

050 HILL J., GANGAROSA L., PARK N.

Iontophoretic application of antiviral and antineoplastic agents

Proc. Am. Assoc. Cancer Res., **18**, 1977, 68 ff

051 HOLYO-TOMOKA M., KLIGMAN A.

Does cellophane tape stripping remove the horny layer?

Arch. Dermatol., **106**, 1972, 767 f

052 JAKOBY C.

Über Hirudin

Dtsch. med. W.schr., **30**, 1904, 1786 f

053 **JÄCKER G., KEMPER F., LÜPKE N., RUSCHE C.**

Über den Einfluß von Depilation, Hautvorbehandlung und Lösungsmitteln auf die cutane Resorption

Ärztl. Kosmet., 1975, 178 ff

054 **KÖSTERING H., KÖNIG F., KOSITZKI H., RIESENKAMP W., HAUNSCHILD N.**

Thrombenbehandlung durch Hirudin

Der Praktische Arzt, **9**, 1973, 3 ff (Sonderdruck)

055 **LANDIS B., ZABINSKI M., LAFLEUR G., BING D., FENTON J.**

Human α- und γ-thrombin differential inhibition with hirudin

Fed. Proc., **37**, 1978, 1445 ff

056 **LANSDOWN A., GRASSO P.**

Physico-chemical factors influencing epidermal damage by surface active agents

Br. J. Dermatol., **86**, 1972, 361 ff

057 **LARSON D.**

Studies show hexachlorophene causes burn syndrome

Hospitals, **42**, 1968, 63 f

058 **MAHRLE G., ORFANOS C.**

Die Cytoarchitektonik der psoriatischen Hornschicht und das psoriatische Keratin mit besonderer Berücksichtigung ihrer Permeabilität

Arch. Dermatol. Forsch., **144**, 1972, 89 f

059 **MARKWARDT F.**

Untersuchungen über Hirudin

Naturwissenschaften, **42**, 1955, 537 ff

060 **MARKWARDT F.**

Die antagonistische Wirkung des Hirudins gegen Thrombin in vivo

Naturwissenschaften, **43**, 1956, 111 ff

061 **MARKWARDT F., HAUPTMANN J., NOWAK G., KLESSEN C., WALSMANN P.**

Thromb. Haemost., **3**, 1982, 226 ff

062 **MARPLES R., DOWNING D., KLIGMAN A.**

Control of free fatty acids in human surface lipids by corynebacterium acnes

J. Invest. Dermatol., **56**, 1971, 127 ff

063 **MARPLES R., DOWNING D., KLIGMAN A.**

Influence of pityrosporum species in the generation of free fatty acids in human surface lipids

J. Invest. Dermatol., **58**, 1972, 155 ff

064 MATOLTSY A., DOWNES A., SWEENEY T.

Studies of the epidermal water barrier
Part II: Investigation of the chemical nature of the water barrier

J. Invest. Dermatol., 50, 1968, 19 ff

065 MITTELSTAEDT R.

Weitere klinisch-experimentelle Untersuchungen zur Wirkung hirudinhaltiger Externa

Arzneim.-Forsch. (Drug Res.), 23, 1973, 581 ff

066 MONTES L., DAY J., WAND C.

Ultrastructural changes in the horny layer following local application of dimethyl sulfoxide

J. Invest. Dermatol., 48, 1967, 184 ff

067 MORIYAMA S.

Studies on percutaneous penetration

Jpn. J. Dermatol., 70, 1960, 919 ff

068 NOVAK E.

Experimental transmission of lidocaine through intact skin by ultrasound

Arch. Phys. Med., 45, 1964, 231 ff

069 ORFANOS C., STRUNK V.

Hydrargyrosis cutis

Z. Hautkr., 52, 1977, 344 f

070 OWENS D., OGURA R., KNOX J.

Adsorption of bath oil in skin diseases

Cutis, 4, 1968, 288 ff

071 PASCHER F., BERGER H.

Systemic reactions to topically applied drugs

Bull. N.Y. Acad. Med., 49, 1973, 613 ff

072 PASSOW H.

Passive Permeabilität von Zellmembranen
(Zur Frage der Penetration durch Poren)

Klin. W.schr., 41, 1963, 130 ff

073 PINKUS H.

Examination of epidermis by the strip method of removing horny layers

J. Invest. Dermatol., 16, 1951, 383 ff

074 PINKUS H.

Examination of the epidermis by the strip method

J. Invest. Dermatol., 19, 1952, 431 ff

075 **POWERS D., FOX C.**

The effect of cosmetic emulsions on the stratum corneum

J. Soc. Cosmet. Chem., **10**, 1959, 109 ff

076 **PRATZEL H.**

Concepts and Nomenclature about Percutaneous Absorption

Europ. J. Klin. Pharm., in Vorbereitung

077 **PRATZEL H., SEEMÜLLER U., DODT J., GEMMERLI R.**

Forcierte und spontane Hautresorption von Hirudin bei Schweinen und am Menschen

Z. Phys. Med., **2**, 1986, 129 ff (Sonderdruck)

078 **REINHARD M., FRANK R.**

Klinisch-Experimentelle Untersuchungen zur Wirkung hirudinhaltiger Externa

Z. Haut- und Geschl.krkh., **10**, 1970, 427 ff (Sonderdruck)

079 **RINGSHAUSEN K.**

Ein Beitrag zur Behandlung von Erfrierungen

Medizin heute, **8**, 1963, 398 ff (Sonderdruck)

080 **SCALA J., McKOSKER D., RELLER H.**

The percutaneous absorption of ionic surfactants

J. Invest. Dermatol., **50**, 1968, 371 ff

081 **SCHAEFER H., ZESCH A.**

Penetration of vitamin A acid into human skin

Acta Derm. Venereol. (Stockholm), **74** <Suppl. C>, 1975, 50 ff

082 **SCHEUPLEIN R.**

Mechanism of percutaneous absorption
I. Routes of penetration and the influence of solubility

J. Invest. Dermatol., **45**, 1965, 334 ff

083 **SCHEUPLEIN R.**

Mechanism of percutaneous absorption
II. Transient diffusion and the relative importance of various routes of skin penetration

J. Invest. Dermatol., **48**, 1967, 79 ff

084 **SCHEUPLEIN R., ROSS L.**

Effects of surfactants and solvents on the permeability of epidermis

J. Soc. Cosmet. Chem., **21**, 1970, 853 ff

085 **SCOTT B.**

The chemistry and physical action of surfactants
(Symposium: Trans. St. Johns Hosp.)

Dermatol. Soc., **51**, 1965, 149 ff

086 SINGER S., NICOLSON G.

The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes

Science, **175**, 1972, 720 ff

087 SINGER E., VINSON L.

The water-binding properties of skin

Toilet Goods Assoc., **46**, 1968, 29 ff

088 STOCK D., DIEZEMANN E., ELL N., GOLLSTEIN J.

Bringt die lokale Blutegelwirkstoffapplikation in Salbenform Vorteile für die Mobilisierung operierter Gelenke ?

Therapiewoche, **29**, 1979, 2626 ff

089 STRECKER H., HACHMANN H., SEIDEL L.

Der Radioimmunobioassay (RIA), eine hochspezifische, extrem empfindliche quantitative Analysenmethode

Chemiker-Zeitung, **103**, 1979, 53 ff (Sonderdruck)

090 STRÜMPER H.

Blutegeltherapie gestern und heute

Deutsche Apotheker-Zeitung, **44**, 1963, 1457 ff (Nachdruck)

091 TRONNIER H.

Weitere experimentelle Untersuchungen zur Wirksamkeit einer Hirudin-haltigen Salbe

Der Hautarzt, **3**, 1969, 114 ff (Sonderdruck)

092 WAHLBERG J.

Percutaneous absorption from chromium (^{51}Cr) solutions of different pH (1,4 - 12,8)

Dermatologie, **137**, 1968, 17 ff

093 WALSMANN P., MARKWARDT F.

Biochemische und pharmakologische Aspekte des Thrombininhibitors Hirudin

Pharmazie, **10**, 1981, 653 ff

094 WESENER G.

Behandlung der oberflächlichen Thrombophlebitis

Ärztliche Praxis, **33**, 1965, 1660 f (Sonderdruck)

095 WESENER G.

Zur Diagnose und Therapie der oberflächlichen Thrombophlebitis (Varicophlebitis) in der Sprechstunde

Z. Haut- und Geschl.krkh., **22**, 1967, 61 ff

096 WESTER R., NOONAN P., MAIBACH H.

The effect of frequency of application on percutaneous absorption of hydrocortisone

Clin. Res., **25**, 1977, 102 f

097 WOLF J.

Das Oberflächenrelief der menschlichen Haut

Z. Mikrosk. Anat. Forsch., **47**, 1940, 351 ff

098 ZESCH A.

Wechselbeziehungen zwischen Haut, Vehikel und Arzneimittel bei der Penetration in die menschliche Haut
II. Vehikel und Penetration

Fette-Seifen-Anstrichm., **76**, 1974, 312 ff

099 ZESCH A., SCHAEFER H.

Penetration kinetics of four drugs in the human skin
Influences of various pharmaceutical vehicles on penetration in vitro

Acta Derm. Venereol. (Stockh.), **54**, 1974, 91 ff

100 ZETTEL G.

Beobachtungen über Exhirud-Salbe bei der Behandlung der Akne vulgaris

Der Landarzt, **13**, 1967, 633 f (Sonderdruck)

MONOGRAPHIEN, LEHRBÜCHER, LEXIKA

101 **ALLGÖWER M.**

Allgemeine und spezielle Chirurgie

Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1976 (3. Aufl.)

102 **BAMBERG G., BAUR F.**

Statistik

Oldenbourg-Verlag, München-Wien, 1985 (4. Aufl.)

103 **BARTHELS M., POLIWODA H.**

Gerinnungsanalysen

Thieme-Verlag, Stuttgart, 1980 (2. Aufl.)

104 **DAVIE E., FUJIKAWA K., KURACHI K., KISIEL W.**

The role of serine proteases in the blood coagulation cascade

in: **MEISTER A.**
Advances in Enzymology, Vol. 48
John Wiley and Sons, New York-Chichester-Brisbane-Toronto, 1979

105 **FIEDLER K., LIEDER J.**

Taschenatlas der Histologie

Franckh`sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart, 1975 (3. Aufl.)

106 **GELLERT W., KÜSTNER H., HELLWICH M., KÄSTNER H.**

Großes Handbuch der Mathematik

Buch und Zeit Verlagsgesellschaft, Köln, 1967

107 **GILLMANN H.**

Transkutane Resorption (aus: Physikalische Therapie)

Thieme-Verlag, Stuttgart-New York, 1981 (5. Aufl.)

108 **HARPER H., LÖFFLER G., PETRIDES P., WEISS L.**

Physiologische Chemie

Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1975

109 **HERRMANN F., IPPEN H., SCHAEFER H., STÜTTGEN G.**

Biochemie der Haut

Thieme-Verlag, Stuttgart, 1973

110 **HERTER K.**

Der medizinische Blutegel und seine Verwandten

Ziemsen-Verlag, Wittenberg (Lutherstadt), 1968

111 **KUSCHINKSKY G., LÜLLMANN H., PETERS T.**

Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie

Thieme-Verlag, Stuttgart, 1978 (8. Aufl.)

112 **LEONHARDT H.**

Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen

Thieme-Verlag, Stuttgart, 1974 (4. Aufl.)

113 **MARKWARDT F.**

Blutgerinnungshemmende Wirkstoffe aus blutsaugenden Tieren

VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1963

114 **MARKWARDT F., LANDMANN H.**

Anticoagulantien

in: **MARKWARDT F.**
Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Bd. 27
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1971

115 **NASEMANN T., SAUERBREY W.**

Lehrbuch der Hautkrankheiten und venerischen Infektionen

Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1979 (3. Aufl.)

116 **ODLAND G.**

Structure of the skin

in: **GOLDSMITH L.**
Biochemistry and Physiology of the Skin
Oxford University Press, New York-Oxford, 1983

117 **PETERSEN T., ROBERTS H., SOTTRUP-JENSEN L., MAGNUSSON S., BAGDY D.**

Primary Structure of Hirudin, A Thrombin-Specific Inhibitor

in: **PEETERS H.**
Protides of the Biological Fluids (Proceedings of the 23th Colloquium)
Pergamon Press, Oxford-New York, 1976

118 **PFEIFER S., PFLEGEL P., BORCHERT H.**

Grundlagen der Biopharmazie

Verlag Chemie, Weinheim-Deerfield Beach, Florida-Basel, 1984

119 **PSCHYREMBEL W.**

Klinisches Wörterbuch

Walter de Gruyter-Verlag, Berlin-New York, 1986 (255. Aufl.)

120 **ROPER N.**

Medical Dictionary

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York, 1981 (13. Aufl.)

121 **SACHS L.**

Angewandte Statistik

Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1974

122 SCHAEFER H., ZESCH A., STÜTTGEN G.

Skin Permeability

Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1982

123 SCHEUPLEIN R., BRONAUGH R.

Percutaneous Absorption

in: GOLDSMITH L.
Biochemistry and Physiology of the Skin
Oxford University Press, New York-Oxford, 1983

124 STÜTTGEN G.

Die normale und pathologische Physiologie der Haut

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York, 1965

125 TREGEAR R.

The permeability of skin to molecules of widely differing properties

in: ROOK A.
Progress in biological science in relation to dermatology, Vol. 2
Cambridge University, London, 1964

126 ÜBERLA K.

Biomathematik (Erläuterungen und Lernhilfen zum Gegenstandskatalog)

Institut für Medizinische Informationsverarbeitung, Statistik und Biomathematik der Universität München, 1976

127 UNSELD D.

Medizinisches Wörterbuch der deutschen und englischen Sprache

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1978

128 VALENTIN H., KLOSTERKÖTTER W., LEHNERT G., PETRY H., RUTENFRANZ J., WEBER G., WENZEL H., WITTGENS H.

Arbeitsmedizin (Band 1: Grundlagen für Prävention und Begutachtung)

Thieme-Verlag, Stuttgart, 1979 (2. Aufl.)

129 VALENTIN H., LEHNERT G., PETRY H., WEBER G., WITTGENS H., WOITOWITZ H.

Arbeitsmedizin (Band 2: Berufskrankheiten)

Thieme-Verlag, Stuttgart, 1979 (2. Aufl.)

130 WACHTER H., HAUSEN A.

Chemie für Mediziner

Walter de Gruyter-Verlag, Berlin-New York, 1975

131 WELLHÖNER H.

Allgemeine und systematische Pharmakologie und Toxikologie

Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1976 (2. Aufl.)

DISSERTATIONS- UND HABILITATIONSSCHRIFTEN

132 BRUCKBAUER H.

Perkutane Resorption von Blutegelwirkstoffen (Eglin und Hirudin) an der isolierten Schweinehaut und im in vivo-Modell an der Maus

Dissertationsschrift (Zahnmedizin), München (LMU), 1984

133 DIETL T.

Proteinasen-Inhibitoren und Proteinasen des Medizinischen Blutegels: Immunologie und Gewebslokalisation

Dissertationsschrift (Humanmedizin), München (LMU), 1985

134 DODT J.

Hirudine, die Thrombininhibitoren des Blutegels "Hirudo medicinalis"

Dissertationsschrift (Chemie/Pharmazie), München (LMU), 1984

135 GASTEIGER C.

Studien zur percutanen Permeation von Blutegelwirkstoffen (Hirudin und Eglin) an der isolierten Schweinehaut

Dissertationsschrift (Humanmedizin), München (LMU), 1984

136 JOPEN-WOLFF B.

Der medizinische Blutegel und seine Wirkstoffe - Eine Übersicht

Dissertationsschrift (Humanmedizin), München (LMU), 1984

137 SEEMÜLLER U.

Inhibitoren aus dem Blutegel Hirudo medicinalis mit Hemmwirkung gegen Chymotrypsin, Subtilisin und die menschlichen Granulozytenproteinasen Elastase und Kathepsin G
Isolierung, Charakterisierung und Studien zum Hemmechanismus

Dissertationsschrift (Chemie/Pharmazie), München (LMU), 1979

138 STÖLZLE A.

Zur percutanen Resorption der Proteinaseinhibitoren Hirudin, Eglin und Bdellin aus dem Blutegel Hirudo medicinalis
In vivo- und in vitro-Studien am Meerschweinchen

Dissertationsschrift (Humanmedizin), München (LMU), 1982

139 PRATZEL H.

Grundlagen zum perkutanen Stofftransport

Habilitationsschrift (Humanmedizin), München (LMU), 1985

*

LEBENSLAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name:	Rainold Walter Friedrich GEMMERLI
Geburtsdatum:	12. Februar 1957
Geburtsort:	Augsburg
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Konfession:	römisch-katholisch
Familienstand:	ledig
Eltern:	Siegfried Gemmerli; Bundesbahnoberamtsrat a.D. Emma Gemmerli, geb. Merz; Hausfrau

SCHULBILDUNG

Volksschule:	1963 - 1967 (in Ottmarshausen, Landkreis Augsburg)
Gymnasium:	1967 - 1976 (in Neusäß, Landkreis Augsburg)

STUDIUM

Fach:	Humanmedizin
Universität:	1976 - 1982 Ludwig-Maximilians-Universität München
Praktisches Jahr:	I. Tertial: Okt. 1981 - Feb. 1982 INNERE MEDIZIN (I. Medizinische Klinik, ehem. Westkrankenhaus Augsburg; CA Prof. Dr. Kaiser)
	II. Tertial: Feb. 1982 - Mai 1982 PÄDIATRIE (I. und II. Kinderklinik Augsburg; CA Prof. Dr. Neidhardt und CA Dr. Haggenmüller)
	III. Tertial: Juni 1982 - Sep. 1982 CHIRURGIE (I. Chirurgische Klinik, ehem. Hauptkrankenhaus Augsburg; CA Prof. Dr. Gumrich)
Abschlüsse:	25.08.1978 Ärztliche Vorprüfung
	30.08.1979 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	21.08.1981 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	06.12.1982 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	13.12.1982 Approbation als Arzt

WEHRDIENST

Feb. 1984:	Einführungslehrgang für Sanitätsoffiziere an der Sanitätsakademie der Bundeswehr in München
März 1984 - Okt. 1984:	Musterungsarzt beim Kreiswehrersatzamt in Bremen
Nov. 1984 - Apr. 1985:	Truppenarzt beim PzGrenBtl 562 in Neuburg/Donau

WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEIT

Dissertation: Beginn im Feb. 1983, Abschluß im Feb. 1987, unterbrochen durch Wehrdienst von Feb. 1984 bis April 1985

Ort der Durchführung: Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie in der Chirurgischen Klinik Innenstadt der Universität München
Doktorvater: Prof. Dr. H. Fritz

Weitere Tätigkeit: 01. Juni 1986 bis 31. März 1987 wissenschaftliche Hilfskraft in der genannten Abteilung zur Fortsetzung tierexperimenteller Studien

ÄRZTLICHE WEITERBILDUNG

01. April - 10. Mai 1987: Gastarzt in der Handchirurgischen Abteilung der Poliklinik der Universität München (LMU)
Leiter: Prof. Dr. K. Wilhelm

Ab 11. Mai 1987: Assistenzarzt in der Chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Gunzenhausen
Chefärzte: Dr. med. W. Ketterle
Dr. med. F. Persch

*

Offsetdruck E. Heuser Bereich Dissertationsdruck
Klausenberg 2, 8900 Augsburg, Telefon 08 21 / 99 25 94